

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y

GINECOLOGÍA

**PAPEL DE LA HORMONA ANTI-MÜLLERIANA
EN EL MANEJO DE LA RESERVA OVÁRICA EN
REPRODUCCIÓN ASISTIDA**

TESIS DOCTORAL

IRIA APARICIO RODRÍGUEZ

Madrid, 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y

GINECOLOGÍA

HOSPITAL LA PAZ

**PAPEL DE LA HORMONA ANTI-MÜLLERIANA
EN EL MANEJO DE LA RESERVA OVÁRICA
EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA**

MEMORIA

Presentada para optar al grado de doctor por la UAM por

Iria Aparicio Rodríguez

Madrid, 2009

DIRECTOR: **Juan Ordás Santo Tomás**, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático de Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe de Servicio de Ginecología del Hospital Universitario “La Paz”.

CO-DIRECTORA: **M. Carmen Cuadrado Mangas**, Doctora en Medicina y Cirugía, Profesora asociada de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefa de Servicio de Reproducción Humana del Hospital Universitario “La Paz”.

CERTIFICAN: Que Doña Iria Aparicio Rodríguez ha realizado bajo nuestra dirección la Tesis Doctoral: “**PAPEL DE LA HORMONA ANTI-MÜLLERIANA EN EL MANEJO DE LA RESERVA OVÁRICA EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA**”, necesaria para optar al grado de Doctor en Medicina. Revisado el presente trabajo, autorizamos la presentación de la citada Tesis Doctoral en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid, a 30 de Septiembre de 2008.

EL DIRECTOR DE LA TESIS LA CODIRECTORA DE LA TESIS

Fdo: Juan Ordás Santo Tomás

Fdo: Carmen Cuadrado Mangas

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Doctor Don **Juan Ordás Santo Tomás**, Director de esta tesis, por su constante estímulo en mi formación como residente, por su apoyo y su fe incondicional en mí.

A la Profesora Doctora Doña **M^a Carmen Cuadrado Mangas**, codirectora de esta tesis, por su constante apoyo, continua motivación, ayuda desinteresada y por constituir un referente personal y profesional, sin la cual este trabajo no habría salido adelante.

A todo el **Servicio de Esterilidad y Reproducción del Hospital La Paz**, por su inestimable ayuda en la inclusión de pacientes en el estudio.

A las Doctoras **Isabel Martínez y Amanda Ospina**, y a todo el servicio de bioquímica del hospital por su total disponibilidad y colaboración desinteresada en las determinaciones de laboratorio.

A Doña **Manuela Fontanillo Fontanillo** de la Fundación Biomédica del Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, por su colaboración imprescindible en el análisis estadístico de los datos.

A mis amigas/os **Emilio, Ber, Laura, Sergio, Elena, Alejandra y Mónica** por estar siempre a mi lado, por creer en mí y dar sentido a la palabra amistad.

A **mi abuela, mis hermanos y mis padres**, por ayudarme a la superación constante como persona y como profesional, y por su constante apoyo y cariño.

El mayor de los agradecimientos y dedicación de esta tesis a **mi hija y marido** por estar detrás de cada palabra, frase, de cada cálculo,...por su amor y apoyo diario.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 RECUERDO ANATOMO-FISIOLÓGICO.....	5
1.2 HISTORIA.....	6
1.3 LA MOLÉCULA DE AMH.....	9
1.3.1 La molécula de AMH bovina.....	9
1.3.2 La molécula de AMH humana.....	10
1.3.3 Precursores de la AMH.....	11
1.3.4 Procesamiento de la AMH.....	12
1.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	14
1.4.1 Mecanismo de acción.....	14
1.4.2 Regresión de los conductos de Müller.....	18
1.4.3 El papel de la AMH en el ovario.....	19
1.4.3.1 La AMH y los folículos primordiales.....	19
1.4.3.2 Acción de la AMH y de la FSH.....	22
1.4.3.3 La AMH en la disfunción ovárica.....	24
2. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA.....	27
2.1 MANEJO DE LA RESERVA OVÁRICA.....	28
2.2 PROPIEDADES DE LOS TESTS DE RESERVA OVÁRICA.....	30
2.3 DISEÑO DE ESTUDIOS PARA LOS TESTS DE RESERVA OVÁRICA.....	31
2.4 LOS TEST DE RESERVA OVÁRICA EN RELACIÓN CON OTROS PREDICTORES DE ÉXITO.....	33
2.5 OTROS TESTS DE RESERVA OVÁRICA.....	34
2.5.1 Marcadores bioquímicos.....	35
2.5.2 Tests dinámicos.....	46
2.5.3 Tests biofísicos.....	52
2.5.4 Modelos multivariantes.....	58
2.6 LA AMH COMO MARCADOR DE RESERVA OVÁRICA: REVISIÓN DEL ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA.....	59

3.	HIPÓTESIS DE TRABAJO/OBJETIVOS.....	65
	3.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	66
	3.2 OBJETIVOS.....	67
4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	69
5.	RESULTADOS.....	75
6.	DISCUSIÓN.....	99
6.1	Definición de baja respuesta.....	102
6.2	Correlación entre los diferentes tests de reserva ovárica y la respuesta del ovario al tratamiento.....	102
6.3	Correlaciones entre los diferentes tests de reserva ovárica.....	103
6.4	Correlación entre la AMH y marcadores indirectos de la respuesta del ovario a la hiperestimulación ovárica controlada (pico máximo de estradiol y dosis total de FSH utilizada).....	104
6.5	El papel de la edad en la predicción de respuesta.....	106
6.6	Elección del punto de corte de la AMH sérica.....	107
6.7	Predicción de gestación de los tests.....	108
6.8	Predicción de baja respuesta a la hiperestimulación ovárica controlada de la AMH.....	110
6.9	Los modelos multivariantes.....	111
6.10	Valor clínico de los Tests de Reserva Ovárica.....	112
6.11	Ventajas de la AMH frente al CFA.....	114
6.12	Costes de los diferentes tests.....	115
7.	CONCLUSIONES.....	117
	APÉNDICE.....	120
	BIBLIOGRAFÍA.....	123

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.

AMH: anti-Müllerian hormone (Hormona anti-Mülleriana)

rhAMH: hormona anti-Mülleriana recombinante humana

AMHR-I: receptor de la hormona anti-Mülleriana tipo I

AMHR-II: receptor de la hormona anti-Mülleriana tipo II

BMP: bone morphogenetic proteins

CFA: conteaje de folículos antrales

DHFR: dihidrofolatoreductasa

E₂: estradiol

ELISA: enzyme – linked immunoabsorbent assay

E: especificidad

FIV: fecundación “in Vitro”

FSH: follicle stimulating hormone (Hormona estimuladora del folículo)

FSHb: FSH basal

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

GnSAF: Factor atenuante del pico de gonadotropinas

ICSI: intracytoplasmatic sperm injection

kD: kiloDalton

L: litro

LH: luteinizing hormone

LR: likelihood ratio

mg: miligramo

MIF: mullerian inhibiting factor

MIS: mullerian inhibiting substance

ml: mililitro

ng: nanogramos

OR: odds ratio

pg: picogramos

RO: reserva ovárica

ROC: receiver operating characteristic

S: sensibilidad

TGF β : Transforming Growing Factor β

TRO: test de reserva ovárica

UI: unidades internacionales

VPN: valor predictivo negativo

VPP: valor predictivo positivo

1. INTRODUCCIÓN

1.1. RECUERDO ANATOMO-FISIOLÓGICO

La hormona anti-Mülleriana, es una glicoproteína dimérica, miembro de la superfamilia de los *Transforming Growing Factor* β (TGF β), factores implicados en el crecimiento y diferenciación, que también incluye las inhibinas, activinas, proteínas morfogenéticas del hueso y factores de crecimiento y diferenciación (*Growth and Differentiation Factors*, GDFs). Los miembros de esta familia juegan un importante papel en las interacciones epitelio-mesenquimales, crecimiento celular, producción de matriz extracelular, y remodelación tisular.⁽¹⁾

También se denomina, en Estados Unidos, “Müllerian inhibiting Substance” (MIS) y “Müllerian Inhibiting Factor” (MIF).

En 1947, Jost demostró que la AMH expresada en los testículos, durante la diferenciación sexual masculina, era la responsable de la regresión de los conductos de Müller, origen del tracto genital femenino.⁽²⁾

En las mujeres, la AMH se expresa en el ovario mucho después de que los conductos Müllerianos pierdan su sensibilidad a la hormona^(3;4). En el ovario humano, la AMH se expresa después de la semana 36 de gestación⁽⁵⁾, mientras que en ratones la producción de AMH comienza en los días inmediatamente posteriores al nacimiento⁽⁶⁾.

1.2. HISTORIA

1.2.1. Inicio teórico

El profesor Alfred Jost († 1991) fue un estudioso de los procesos que llevan a la diferenciación sexual. En 1947 sugirió la existencia de un factor testicular específico, responsable de la regresión de los derivados müllerianos en el feto masculino, al que llamó “*hormone inhibitrice*”⁽²⁾. Probó esta teoría en 1952 implantando un cristal de testosterona y un fragmento de tejido testicular cerca del ovario de fetos de conejo, comprobando que el tejido testicular inducía la regresión del conducto de Müller adyacente, en contra de lo que ocurría con la testosterona.

Con esto, Jost concluyó que debía existir una sustancia testicular diferente de la testosterona que era responsable de la regresión de los derivados müllerianos⁽⁷⁾.

1.2.2. Cuantificación de la actividad anti-Mülleriana

En 1969, Régine Picon, investigadora en el laboratorio de Jost, abrió el camino de la purificación de esta molécula, “*Müllerian inhibitor*”, desarrollando un ensayo biológico semicuantitativo (en uso en la actualidad) capaz de medir su actividad, utilizando tractos genitales de fetos de rata en los días 14 a 15 postcoito⁽⁸⁾.

1.2.3. Purificación de la molécula

Picard y cols. acuñaron el término “*Anti-Müllerian Hormone*” y presentaron en 1978 el esbozo inicial de la estructura de la molécula de AMH bovina, inicialmente como una macromolécula no dializable^(9;10) que no atraviesa membranas vitelinas por ser de naturaleza dimérica y glicoproteica⁽¹¹⁾. La purificación de la molécula se inició utilizando testes fetales y neonatales de la especie bovina, dado el mayor tamaño de éstos que los hace más fáciles de conseguir y manipular. En 1984, estos autores lograron purificar la molécula en un medio de incubación por medio de inmunocromatografía con anticuerpo monoclonal⁽¹²⁾.

1.2.4. Investigación genética

Poco después, en 1986, se consiguió la clonación del ADNc bovino⁽¹³⁾. Se inició el estudio de su efecto anti-tumoral⁽¹⁴⁾ con lo que, en los años posteriores, se avanzó notablemente en el conocimiento de su mecanismo de acción⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. Ese mismo año se publican los resultados de la clonación del gen humano de la hormona anti-Mülleriana gracias a las investigaciones de Cate et al.⁽¹⁸⁾, que lo secuenciaron y localizaron en el cromosoma autosómico 19, dentro de la subbanda p13.2-p13.3.

1.2.5. Avances en las técnicas de análisis

Los descubrimientos relativos a la molécula y la genética que regula la producción corren paralelos al desarrollo de métodos de medida cada vez más sensibles y específicos, no sólo de la actividad de la hormona, sino de su concentración en líquidos biológicos.

Inicialmente se consiguió detectar la producción de AMH en el testículo durante los periodos fetal y perinatal^(8;19-22) por medio de técnicas inmunocitoquímicas, pero la invasividad de la obtención de la muestra limitaba su indicación⁽²³⁾; además, los anticuerpos monoclonales que se utilizaban eran zooespecíficos, es decir, habían sido desarrollados contra la AMH bovina.

Este desarrollo de técnicas inmunohistoquímicas más sensibles permitió extender este período hasta la pubertad⁽²³⁻²⁷⁾ e incluso, aunque en cantidades muy pequeñas, al ovario adulto⁽²⁸⁻³¹⁾. Hasta la llegada de métodos inmunohistoquímicos capaces de medir los niveles de AMH humana en suero circulante, las posibles aplicaciones clínicas de la investigación sobre la AMH se han visto retrasadas.

Finalmente, en 1990, se desarrolló un ensayo ELISA (*Enzyme- Linked Immunoabsorbent Assay*), que permite cuantificar la AMH circulante en suero. La sensibilidad de esta prueba es adecuada, capaz de detectar concentraciones de 0.1-0.5 ng/ml⁽²⁵⁻²⁷⁾.

1.3 LA MOLÉCULA DE AMH

Como se ha descrito anteriormente, la AMH es un miembro de una gran familia multigénica de glicoproteínas⁽¹⁸⁾, con diversas funciones relacionadas con el crecimiento y la diferenciación celular^(32;33). Entre las moléculas que la forman cabe distinguir TGF- β ⁽³⁴⁾, inhibinas⁽³⁵⁾, activinas^(36;37), BMP (Bone Morphogenetic Proteins)⁽³⁸⁾, el producto predicho del gen decapentaplégico de *Drosophila*^(39;40), la proteína Vg-1 de *Xenopus*⁽⁴¹⁾, la proteína relacionada con Vgr-1 de mamíferos⁽⁴²⁾ y el factor de crecimiento GDF-1⁽⁴³⁾.

1.3.1. La molécula de AMH bovina

La purificación de la molécula de AMH bovina se consiguió inicialmente utilizando la cromatografía de intercambio iónico seguida por cromatografía de afinidad por tinción de lectina pero ofrecía una purificación incompleta. La fracción obtenida que presentaba actividad anti-Mülleriana se denominó Green-III^(44;45).

La homogenización de la molécula llegó con la inmunocromatografía con anticuerpo monoclonal, precedida por una precipitación en sulfato de amonio y cromatografía de intercambio aniónico⁽¹²⁾. Las últimas técnicas de purificación mejoran considerablemente la biodisponibilidad de la molécula obtenida⁽⁴⁶⁾.

AMH bovina contiene una alta proporción de residuos hidrofóbicos, como leucina y prolina, mientras que los residuos ácidos y básicos están representados aproximadamente en igual cantidad. El núcleo aminoacídico se une a carbohidratos a través de enlaces tanto N como O-oligosacáridos, siendo el total de azúcares del 13.6%⁽⁴⁷⁾.

La molécula de AMH bovina original está formada por subunidades que se unen con puentes disulfuro, en dímeros o tetrámeros. En condiciones reductoras, estas moléculas grandes se dividen en moléculas monoméricas de 72 kD (según Picard y Josso⁽¹²⁾) o en fragmentos ligeramente diferentes de 70 y 74 kD que comparten el mismo extremo N-terminal, lo cual sugiere que el péptido menor es un producto de la proteólisis del mayor (según Cate y cols.⁽¹⁸⁾).

1.3.2. La molécula de AMH humana

AMH recombinante humana (rhAMH) se obtuvo a partir de un medio de cultivo de células ováricas de hamster chino al que se introdujo por transfección el gen humano de AMH, bajo el control de un promotor viral, junto a DNA recombinante del gen de la dihidrofolatoreductasa (DHFR), todo ello dentro del plásmido pAdD26. El conjunto se transporta en el vector pSV2^(48;49) cuya eficiencia de transfección se facilita con otro gen, el facilitador SV40, el cual a su vez es también transportado por el vector pSV2. Este transporte conjunto permite la coamplificación de ambos genes, el de la DHFR y el de la AMH humana. AMH producida de esta forma se

purificó desde el medio de cultivo mediante una combinación de intercambio iónico, lentil-lectina y cromatografía de inmutafinidad con un anticuerpo monoclonal⁽⁵⁰⁾.

El patrón electroforético con Western Blot de rhAMH obtenida (en un gel con gradiente 4-30% de poliacrilamida en presencia de sodio-dodecil-sulfato) muestra bandas de migración en las que se pueden diferenciar fragmentos de varios tamaños: en condiciones no reductoras (sin mercaptoetanol) AMH migra como un dímero de 140 kD, aunque también se ven agregados de mayor peso molecular. En condiciones reductoras (sin mercaptoetanol) la hormona se disocia en subunidades de 70 kD, por ruptura de puentes disulfuro. Existe una banda inferior de 57 kD que representa el fragmento proteolítico N-terminal. El extremo C-terminal es muy pequeño y migra fuera del gel⁽⁴⁸⁾.

1.3.3. Precursores de AMH

1.3.3.1. Precursor de AMH humana

AMH humana se sintetiza como un precursor de 560 aminoácidos, en forma de dímero de dos unidades idénticas unidas por puentes disulfuro que pesa 140 kD⁽⁵¹⁾. Comienza con una porción de encabezamiento de 24 aminoácidos, los primeros 18 son una secuencia señal. Otros 8 residuos adicionales se eliminan en la formación de la proteína madura⁽¹⁸⁾.

1.3.3.2. Comparación entre especies

La clonación de los genes de ratón⁽⁵²⁾ y rata⁽⁵³⁾ permite comparar la secuencia proteica de los precursores de AMH en cuatro especies. El precursor bovino es el mayor, con 575 aminoácidos, seguido por el humano con 560, ratón con 555 y rata 553 residuos. Todos poseen una secuencia corta inicial, un péptido señal⁽⁴⁸⁾.

La homología de AMH humana con la AMH bovina es del 78%, más marcada en el extremo C-terminal (96.3%)⁽⁵⁴⁾. Es en esta zona C-terminal donde reside la homología entre los miembros de la superfamilia TGF- β , con un rango de entre el 20 y el 40% de los aminoácidos. Esta región contiene los siete residuos de cisterna que forman los puentes disulfuro, además de otros grupos de aminoácidos muy preservados entre las moléculas de esta familia⁽⁵⁵⁾. Paradójicamente, la mayoría de las diferencias del extremo C-terminal es mucho menos homólogo, en torno al 68% entre humana y bovina, aunque más entre rata y ratón, con un 89% de homología.

1.3.4. Procesamiento de AMH

El 5-20% de la rhAMH se rompe por dos sitios monobásicos^(48;56), el primero 109 aminoácidos más allá del extremo C-terminal, entre Arg₄₂₇ y Ser₄₂₈, (el cual está localizado en el 5º exón del gen de AMH en humanos, bovinos y ratas) y el segundo entre Arg₂₂₉ y Ser₂₃₀. Se conoce la proteasa que interviene en el *splicing* de la molécula, la llamada Pc5, así como el gen

que la codifica⁽⁵⁷⁾. El procesamiento es conducido a término por la plasmita, la cual induce una ruptura mayoritaria de la molécula entre Arg₄₂₇ y Ser₄₂₈, dando lugar a dos fragmentos diméricos, uno mayor N-terminal de 110 kD (inactivo por sí solo, que puede dividirse por el sitio secundario de ruptura si se expone a plasmita en fragmentos de 34 y 22 kD⁽⁵⁶⁾) y otro menor C-terminal de 25 kD, los cuales quedan asociados en un complejo no covalente.

Este complejo puede romperse por tratamiento ácido o por ebullición; estos dos métodos inactivan la molécula, por lo que no pueden usarse en el estudio del sitio bioactivo de los fragmentos de proteólisis. Este problema se ha solucionado empleando deoxicolato como agente disociador⁽⁵⁸⁾ y también separando los fragmentos C y N terminales en una columna de gel de filtración equilibrada en ácido acético 1M con 0.3 mg/ml de polietilenglicol 3350 a 4°C. Estas muestras generadas en ácido se liofilizan y resuspenden en HCl 1mM antes de su uso para prevenir así la agregación que destruiría la bioactividad. De esta forma se puede llegar al mapeado del sitio activo de la molécula. Tras inducir la disociación sólo el fragmento C-terminal muestra actividad biológica⁽⁵⁹⁾. Esto sugiere que este extremo conservado es el portador de la actividad.

Los mecanismos de procesamiento desde el precursor hasta la proteína madura ocurren en otros miembros de la familia TGF- β : el precursor de TGF- β se segrega como una molécula grande e inactiva, en la cual un monómero de 25 kD C-terminal está asociado de forma no

covalente a otro dímero, llamado péptido asociado a la latencia de TGF- β ⁽⁶⁰⁾. El dímero C-terminal debe separarse para desarrollar la actividad de la molécula en forma de homodímeros de 110 a 130 aminoácidos unidos con puentes disulfuro para ser biológicamente activos⁽⁵⁵⁾. De esta forma, los complejos asociados a latencia regulan la bioactividad de los extremos C-terminales⁽⁶¹⁾. No está claro que este tipo de procesamiento sea necesario en el caso de AMH in vivo, ya que no posee un sitio de ruptura dibásico, y la molécula de AMH sin fraccionar es biológicamente activa en cultivo de órganos. No obstante, si se altera la secuencia y se cambia Arg por Tre en el sitio de ruptura, la AMH mutante resultante, indivisible, no es capaz de inducir regresión de los conductos de Müller en un cultivo orgánico⁽⁶²⁾.

1. 4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

1.4.1. Mecanismo de acción

Los miembros de la familia TGF- β tienen sus efectos a través de dos tipos de receptores serin-treonin-kinasa, denominados tipo I y tipo II, y de dos efectores citoplasmáticos, Smads regulados por receptores (R-Smad) y Smad comunes (Smad4). El receptor primario, tipo II, se une al ligando y fosforila al receptor tipo I. Una vez activado, este último fosforila el R-Smad, que interactúa con el Smad4. Este complejo es posteriormente transportado al núcleo donde se une a un elemento de unión al Smad (SBE), en el promotor de la diana o en los genes⁽⁶³⁾.

Hasta la fecha, se han clonado cinco receptores tipo II, seis receptores tipo I y cinco proteínas R-Smad. Los TGF- β y las activinas, a través de T β R-II y ActR-II o ActR-IIB, respectivamente, activan los receptores Alk1 y Alk2 de tipo I y los R-Smad1, R-Smad5 o R-Smad8.

Los diferentes componentes del patrón de señalización de la AMH se han descubierto por homología con otros miembros de la familia de TGF- β .

1.4.1.1 Receptores de AMH tipo II

El ADNc del receptor de AMH primario o tipo II (AMHR-II), fue clonado en 1994 en la rata⁽⁶⁴⁾ y en el conejo⁽⁶⁵⁾, utilizando genes procedentes del testículo y el ovario, respectivamente. Un año más tarde se aisló el gen humano⁽⁶⁶⁾. Se localiza en el cromosoma 12 y está constituido 11 exones repartidos en más de 8 kbp. Los tres primeros exones codifican para el dominio extracelular, el cuarto para el dominio transmembrana, y los últimos siete exones para el dominio kinasa intracelular.

El mensajero del AMHR-II se expresa de forma específica por los órganos diana de la AMH, como los conductos de Müller y las gónadas de ambos sexos. Los estudios de hibridación in situ han demostrado que, en los conductos de Müller, el ARNm del AMHR-II se expresa en las células mesenquimales que rodean el epitelio^(64;65), siguiendo un gradiente craneo-caudal⁽⁶⁷⁾, y desaparece en el varón tras la regresión de los conductos de Müller. En el ovario, el AMHR-II se expresa desde la vida fetal hasta la etapa

adultas en las células de la granulosa de los folículos preantrales y antrales⁽⁶⁸⁾.

En el testículo, se expresa desde el periodo fetal hasta la pubertad. Su expresión continúa hasta la etapa adulta en roedores, con un máximo en el estadio VII del ciclo de espermatogénesis, en el momento del pico de AMH⁽⁶⁹⁾, pero se reprime tras la pubertad en conejos⁽⁶⁵⁾. Inicialmente descubierta en las células de Sertoli, su presencia fue detectada posteriormente en células de Leydig adultas⁽⁷⁰⁾.

Como sucede en todos los receptores tipo II de la familia TGF- β , el mensajero del AMHR-II se traduce en una proteína de 82kDa⁽⁷¹⁾, que se corresponde con el peso molecular extraído de su secuencia de nucleótidos y de la presencia de 2 cadenas N-glucosidasa. Esta forma del receptor es la madura, con la que se expresa en la superficie de la célula, a la que se une la AMH y la que es insensible a la endoglucosidasa H.

El receptor de AMH tipo II es altamente específico, desde que su disrupción en ratones origina un fenotipo similar al de los ratones con déficit de AMH, como la persistencia de los derivados müllerianos y la hiperplasia de las células de Leydig en machos^(72;73).

1.4.1.2 Receptores de AMH tipo I

Dado que ha habido numerosos intentos de clonar un receptor tipo I de AMH sin éxito, se ha probado si la AMH podría usar uno de los receptores tipo I de la familia de los TGF- β para llevar a cabo sus efectos. Se estudiaron varios criterios: la capacidad del receptor tipo I de interactuar con AMHR-II de una forma ligando-dependiente, su coexpresión con AMHR-II en células diana de AMH, la capacidad de una versión dominante negativa o un oligómero anti-*sense* de bloquear un efecto de la AMH, y los defectos inducidos por su disrupción o mutación “in vivo”.

Alk6

El primer receptor de AMH tipo I identificado⁽⁷⁴⁾, Alk6, fue aislado de los seis receptores tipo I de la familia TGF- β por su capacidad de interactuar de una manera dependiente de ligando con AMHR-II en células CHO que expresan de forma permanente AMHR-II humana (CHO-3W)⁽⁷⁵⁾.

Alk2

Aunque Alk2 no interactúa con AMHR-II en células CHO-3W, se coexpresa con AMHR-II en todas las células diana de la AMH, en particular en células mesenquimales que rodean los conductos de Müller durante el periodo crítico de la regresión Mülleriana⁽⁷⁶⁾.

Alk3

Alk3 interactúa fuertemente con AMHR-II en las células CHO-3W; su perfil de expresión en los órganos diana de la AMH no ha sido estudiado y de acuerdo con algunos informes⁽⁷⁶⁾, su versión negativa dominante no bloquea la estimulación de la AMH de T1x2 en células P19. Sin embargo, fue demostrado en 2002 que la disrupción selectiva de Alk3 en los órganos diana conduce a una persistencia de los conductos de Müller en ratones, un fenotipo comparable al producido por la disrupción de los genes de AMH o AMHR-II, sugiriendo que Alk3 media la regresión de la AMH de los conductos de Müller⁽⁷⁷⁾.

1.4.2. Regresión de los conductos de Müller

En el embrión de los mamíferos, ambos sexos son inicialmente indistinguibles. El sistema reproductor del embrión masculino y femenino consiste en una gónada indiferenciada y dos conductos, los de Wolff y los de Müller, precursores de los tractos reproductores masculinos (epidídimo, conductos deferentes y vesículas seminales) y femeninos (trompas de Falopio, útero y parte superior de la vagina), respectivamente. Por tanto, el embrión es inicialmente indiferenciado, y el correcto desarrollo sexual depende de la producción y respuesta a las hormonas testiculares. En el embrión masculino, la AMH, producida por las células de Sertoli, de los testículos embrionarios en diferenciación, provoca la pérdida del conducto de Müller, y la testosterona producida por las células de Leydig estimula el desarrollo de los conductos de Wolff⁽⁷²⁾.

Los conductos de Müller forman como una invaginación del epitelio celómico lateral a los conductos mesonéfricos, y la molécula de señal Wnt-4 es crucial para su desarrollo⁽⁷⁸⁾. En la región de los conductos sexuales en desarrollo, la expresión de Wnt-4 está ausente del epitelio y mesénquima del conducto de Wolff, pero se expresa fuertemente en el mesénquima que limita el conducto de Müller recientemente formado.

La señal Wnt-4 derivada del mesénquima es esencial para los estadios iniciales de la morfogénesis ductal⁽⁷⁸⁾. El conducto de Müller formado, produce entonces niveles elevados de otro miembro de la familia Wnt, el Wnt-7, que hace al mesénquima competente para responder a la señal de la AMH a través de su receptor⁽⁷⁹⁾. La AMH actúa sobre el epitelio ductal según un mecanismo paracrino, dado que las células mesenquimales que rodean el conducto de Müller expresan el receptor tipo II (AMHR-II)^(64;65).

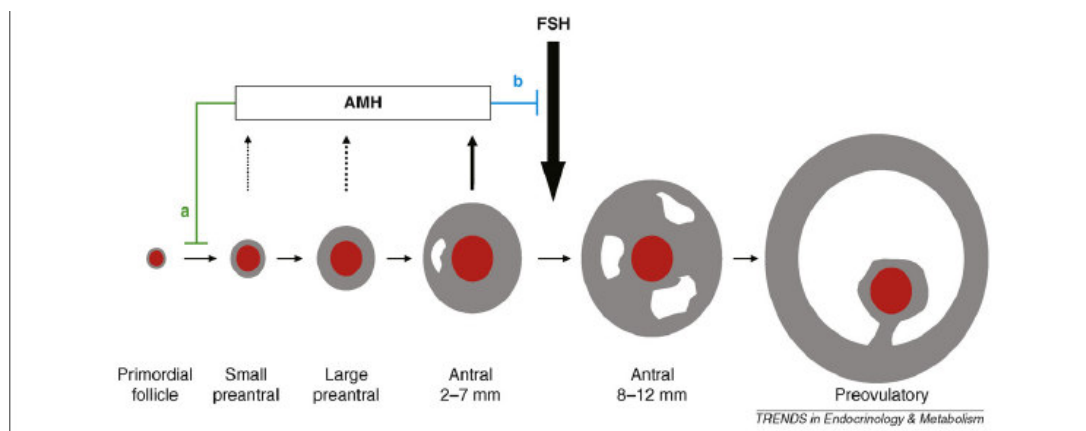
Por tanto, la formación del conducto de Müller y su regresión en el embrión humano requieren la interacción mesénquima-epitelio sucesiva y temporal.

1.4.3. El papel de la AMH en el ovario

1.4.3.1. La AMH y los folículos primordiales

Durante la diferenciación sexual femenina la AMH no se expresa en el ovario. La AMH se expresa por primera vez en las células de la granulosa de los folículos primordiales reclutados, encontrados por primera vez en ovarios

de ratas el día 3 o 4 de vida postnatal⁽⁶⁾, y en el feto humano a partir de la 36 semana de gestación⁽⁵⁾. La AMH continúa expresándose en los folículos en crecimiento del ovario hasta que han alcanzado el tamaño y estadio de diferenciación en el que serán seleccionados para dominar por la acción de la hormona estimulante de los folículos (FSH) hipofisaria. En la rata esto ocurre en el estadio antral inicial en folículos pequeños en crecimiento⁽⁸⁰⁾, y en humanos en folículos antrales de 4-6 mm de tamaño⁽⁸¹⁾. Por tanto, la AMH se expresa en folículos reclutados del pool de folículos primordiales que no han sido seleccionados para la dominancia. Antes y después de estos dos importantes puntos de regulación en el ovario, la AMH no se expresa.



El papel de la AMH en los dos compartimentos principales de desarrollo folicular del ovario normal (de Broekmans et al., 2008)

Este patrón de expresión indicó que la AMH debía tener un papel importante en la regulación del número de folículos en crecimiento y de su selección para la ovulación. Estas funciones potenciales de la AMH se investigaron utilizando modelos de ratas sin AMH (AMH-null)⁽⁸²⁾.

Los ovarios de las ratas AMH-null y del tipo salvaje de la misma camada fueron seccionados y todos sus folículos contados y separados en clases diferentes basándose en su tamaño y estado de atresia. Los ovarios de los ratones AMH-null eran mas grandes que aquellos de los animales salvajes, y el aumento de peso estaba ocasionado por un número tres veces mayor de pequeños folículos no atrésicos en crecimiento. Parecía que este conteo mayor era debido a un aumento del reclutamiento desde el pool primordial porque su tamaño se encontraba disminuido de forma significativa en animales AMH-null comparado con el tipo salvaje.

La mayor tasa de reclutamiento de folículos primordiales llevaría a un agotamiento prematuro del pool folicular causando una anovulación más temprana en animales de edad, lo que ha sido comprobado comparando los dos grupos de animales⁽⁸³⁾, objetivándose un cese de ovulaciones más temprano en el grupo AMH-null.

Un hallazgo interesante fue la detección de un fenotipo intermedio en las ratas heterozigotas para el alelo AMH-null. Esta acción del gen de AMH dosis dependiente podría indicar que la producción o secreción ovárica no se encuentra bajo un control retroactivo estricto, sino que depende de la actividad intrínseca del propio gen.

Para investigar si los efectos de la AMH se producen directamente en los folículos primordiales, ovarios neonatales de ratas AMH-null de dos días de edad fueron cultivados “in vitro” en presencia de AMH. Tras dos días de

exposición a AMH, se hallaron aproximadamente el 50% menos de folículos en crecimiento, mostrando que la AMH podría afectar de forma directa a los folículos primordiales⁽⁶⁾. El receptor de AMH tipo II, que es el único receptor tipo II de la hormona, se expresa en el ovario inmediatamente tras el nacimiento, cuando los folículos primordiales aún no se han formado y se sigue expresando a lo largo de toda la vida⁽⁶⁾. Por tanto, el efecto de la AMH es sobretudo en las células pre-granulosas que rodean al ovocito en el folículo primordial.

1.4.3.2. Acción de la AMH y de la FSH

Las determinaciones hormonales en hembras AMH-null revelaron que la FSH en estos animales era baja comparada con los animales de tipo salvaje, y que a pesar de estos niveles bajos de FSH, el número de folículos en crecimiento estaba aumentado, sugiriendo que en ausencia de AMH, los folículos podrían ser más sensibles a FSH⁽⁸²⁾. Esta hipótesis se confirmó con el cultivo de folículos preantrales de rata “in Vitro”. La AMH inhibía el crecimiento folicular FSH-dependiente de una forma tiempo dependiente, de modo que los folículos cultivados en presencia de AMH tenían un diámetro menor⁽⁸⁴⁾. Este efecto de la AMH era, fundamentalmente, el resultado de una disminución en la proliferación de las células de la granulosa y era consistente con los resultados obtenidos en otros estudios “in vitro”.

El efecto de la AMH en los folículos sensibles a FSH fue testado posteriormente en un modelo “in vivo” en el que la dinámica folicular se

comparó en animales tipo salvaje y AMH-null en presencia de concentraciones séricas altas (con inyecciones adicionales de FSH) y bajas (tras tratamiento con antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas) de FSH⁽⁸⁴⁾. Este estudio mostró que, a pesar de los bajos niveles de FSH, se encontraron más folículos en crecimiento en los animales AMH-null que en los salvajes. También en presencia de niveles elevados de FSH, la estimulación del crecimiento folicular fue más pronunciado en ratas AMH-null que en las de tipo salvaje, tanto en términos de número como de estadio de desarrollo⁽⁸⁴⁾. Por tanto, tanto los estudios “in vivo” como “in vitro” muestran que los folículos son más sensibles a FSH en ausencia de AMH.

Los efectos inhibitorios de la AMH en la sensibilidad a FSH de los folículos podrían jugar un papel importante en el proceso de selección. Durante la selección, un grupo de folículos se selecciona del grupo de folículos en crecimiento productores de AMH, para continuar su desarrollo hasta el estadio preovulatorio. En roedores, la selección se produce durante el estro como resultado del pico secundario de FSH. Se cree que, dependiendo de su estadio de desarrollo, cada folículo requiere una concentración de FSH determinada para continuar su crecimiento, de modo que cada uno establece su punto de corte de FSH. Esta concentración debe superarse para asegurar la selección.

Dado que la AMH afecta la sensibilidad a FSH de los folículos, podría jugar un papel importante en la determinación de qué folículos deben ser seleccionados y cuáles deben ser eliminados a través de la atresia. Dicho

papel se sostiene por el diferente patrón de expresión de la AMH en folículos no atrésicos grandes preantrales y pequeños antrales en el ovario de la rata⁽⁶⁸⁾. Aunque indistinguibles morfológicamente, algunos folículos muestran una menor expresión de AMH que otros, y estos folículos podrían ser más sensibles a FSH, y más propensos a ser seleccionados en el pico de FSH secundario.

1.4.3.3 La AMH en las disfunciones del ovario

Debido al papel que tiene la AMH en el desarrollo folicular primario, los niveles séricos de la hormona podrían aportar información novedosa en pacientes con función ovárica anormal, como la anovulación o el agotamiento folicular prematuro. LA información acerca del desarrollo folicular inicial sería de gran interés en las mujeres con el Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP). En ausencia de ciclos menstruales (amenorrea), la quiescencia ovárica puede deberse al insuficiente estímulo gonadotrópico o al agotamiento folicular del ovario. Debido a que el cambio en los niveles séricos de AMH puede preceder al de otros marcadores endocrinos como la inhibina B o el estradiol en la transición menopáusica⁽⁸⁵⁾, sería un marcador fiable del estado funcional ovárico. En este aspecto, la AMH, podría entonces ser usada como parámetro inicial de cribado en predicción de respuesta de los SOP a la inducción de ovulación, y la inducción de ganancia ponderal en pacientes con anorexia nerviosa, o para el manejo del daño ovárico producido por el uso de agentes quimioterápicos en pacientes con cáncer.

Síndrome del Ovario Poliquístico

El Síndrome del Ovario poliquístico (SOP) es la alteración reproductiva más frecuente en mujeres, afectando al 10% de la población femenina. Con cierta frecuencia, las pacientes con SOP también presentan otras alteraciones endocrinas como obesidad, resistencia a la insulina y síndrome metabólico. La morfología ovárica en el SOP está correctamente caracterizada, incluyendo un número aumentado de folículos de tamaño intermedio. Parece que el reclutamiento ovárico inicial está aumentado, junto con la maduración interrumpida en el estadio del reclutamiento folicular cíclico, a pesar de existir niveles normales de FSH.

Numerosos estudios han demostrado que los niveles de AMH de las pacientes con SOP están aumentados en 2 o 3 veces, lo que concuerda con el número aumentado de folículos preantrales y antrales pequeños productores de AMH^(257,274). Por tanto, los niveles de AMH están relacionados con el número de folículos, y los niveles séricos de LH y Testosterona, marcadores conocidos del SOP. Como marcador del número de folículos podría ser válido para establecer la extensión del síndrome^(86;87), así como para predecir la normalización del patrón menstrual tras la pérdida de peso.

Hipogonadismo

Según lo esperado, la reserva ovárica está disminuida en mujeres que han sufrido cáncer en su infancia y que fueron sometidas a quimioterapia,

como aquellas mujeres que presentan niveles elevados de FSH y disminuidos de AMH, incluso antes de que existan alteraciones claras en la inhibina B y el estradiol^(88;89). Por tanto, la AMH parece ser el único predictor lo suficientemente sensible para detectar el daño ovárico en un estadio inicial⁽⁹⁰⁻⁹²⁾. De la misma manera, los niveles de AMH son indetectables en mujeres que presentan Fallo Ovárico Precoz^(93;94).

2. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

2.1 MANEJO DE LA RESERVA OVÁRICA

La reserva ovárica (RO) puede considerarse normal en condiciones donde la estimulación con gonadotropinas exógenas produce un desarrollo de al menos 8-10 folículos y la recuperación del correspondiente número de ovocitos sanos en una punción folicular⁽⁹⁵⁾. Con estos resultados, las posibilidades de conseguir un recién nacido vivo mediante FIV son óptimas.

En general, la edad de la mujer es una forma sencilla de obtener información acerca de su reserva ovárica, tanto del aspecto cualitativo como del cuantitativo. Sin embargo, en vista de las sustanciales variaciones en cuanto a la disminución de la capacidad reproductiva con la edad⁽⁹⁶⁾, existe la necesidad de identificar a las mujeres relativamente jóvenes con una reserva ovárica claramente disminuida, así como mujeres alrededor de la edad media en la que la fertilidad se pierde de forma natural (41 años), pero que tienen una reserva ovárica adecuada.

En términos clínicos, tratamos de identificar aquellas pacientes con un riesgo elevado de tener una baja respuesta a la estimulación ovárica y/ o una baja probabilidad de lograr gestación mediante FIV, así como aquellas que aún producen suficientes ovocitos para tener una probabilidad elevada de conseguir embarazo incluso si la mujer es de edad avanzada. Si fuese posible identificar esas categorías de mujeres, entonces el manejo podría individualizarse, por ejemplo mediante ajustes de la dosis de estimulación o por esquema de tratamiento⁽⁹⁷⁾, aconsejando la no iniciación de un ciclo de

FIV, o indicando la necesidad de una iniciación precoz del tratamiento antes de que la RO haya disminuido demasiado.

La RO se define corrientemente como el número y calidad de los folículos que quedan en el ovario en un momento determinado. Una medición cuantitativa adecuada de la RO sería el conteo de todos los folículos presentes en ambos ovarios, como los realizados en estudios postmortem⁽⁹⁸⁾. Por razones obvias, el tamaño real de la reserva de folículos del ovario no ha sido utilizado como *gold standard* de evaluación, aparte de un estudio⁽⁹⁹⁾ diferente donde el conteo del ovario completo, sirvió como referencia para diferentes tests de RO. En su lugar, se emplean múltiples variables aproximativas del tamaño del pool, como la respuesta del ovario a la hiperestimulación con FSH exógena en FIV, y la aparición de menopausia o transición menopáusica, dado que estos eventos se determinan de forma cuantitativa.

Aunque están relacionados, la calidad del ovocito liberado del folículo dominante durante la ovulación representa el otro aspecto de la RO. Las variables utilizadas para la valoración de la calidad ovocitaria son la probabilidad de embarazo en tratamientos de infertilidad como la Inseminación intrauterina o la FIV, o en el seguimiento de parejas durante y después de los estudios iniciales realizados.

Más adelante veremos como en la mayoría de los estudios en los que se evalúan los test de RO, tanto la respuesta ovárica como la existencia de

gestación en FIV, sirven de referencia a la hora de evaluar la idoneidad del test en estudio. La respuesta ovárica a una estimulación adecuada, podría ser considerada la representación más adecuada, aunque indirecta, del pool de folículos primordiales, ya que es una condición continuamente presente en la persona a la que se le realiza la prueba. Por el contrario, el resultado de gestación, puede estar influenciado por otros muchos factores más allá de la calidad ovocitaria, y, por tanto, del embrión, de forma aislada.

Sólo en el caso de que la gestación se estudiase en una serie de ciclos de tratamiento, representaría una variable estimativa sólida para la RO. La mayor parte de los test de RO son adecuados a la hora de predecir la respuesta del ovario, pero fallan con frecuencia al predecir la gestación, especialmente si sólo se ha estudiado un ciclo de FIV.

2.2 PROPIEDADES DE LOS TESTS DE RESERVA OVÁRICA

La evaluación de los tests de RO empleando la respuesta ovárica y/o gestación como referencia o variables de resultado, debería incluir la capacidad de predicción y el valor clínico del test. La idoneidad se refiere al grado en que el resultado se predice correctamente. Los estadísticos de idoneidad incluyen la *Sensibilidad* (Tasa de identificación correcta de los casos de baja respuesta), la *Especificidad* (Tasa de identificación correcta de los casos de repuesta normal), *Likelihood Ratio* (Cuántas veces el resultado del test es más probable en una mujer con baja respuesta con respecto a una con respuesta normal) y *Odds Ratio* diagnósticas (razón de resultados

positivos del test en caso de baja respuesta entre la razón de resultado positivo en aquellos casos sin baja respuesta). Para identificar todos los casos que van a responder pobremente a la estimulación, sin catalogar de forma errónea a mujeres normorrespondedoras, el test debe tener una sensibilidad y especificidad elevadas^(100;101).

El área bajo la curva ROC proporciona información sobre la capacidad discriminatoria global del test. Valores de 1 indican perfección, y los próximos a 0,5 se traducen en completa ausencia de discriminación.

El *valor clínico* incorpora la cuestión de si la aplicación del test con un determinado punto de corte cambiará el manejo práctico, los costes, la seguridad o las tasas de éxito en una población concreta. Se relaciona con los resultados falsos positivos y falsos negativos en relación con las consecuencias de estos resultados para las decisiones clínicas. También implica la tasa de resultados anómalos del test, que desencadenan decisiones erróneas dentro de la población de interés.

2.3 DISEÑO DE ESTUDIOS PARA LOS TESTS DE RESERVA OVÁRICA

Los estudios sobre la idoneidad predictiva y valor clínico de estas pruebas deberían ser prospectivos en su diseño, deberían examinar cohortes de pacientes en tratamiento de FIV, sin exclusión de los casos con signos de reserva ovárica disminuida y el manejo del paciente no debería

modificarse en función del resultado de la prueba a estudio. Además, la evaluación debería ser igualmente ponderada para cada caso y de la misma manera, cada caso debería contribuir al análisis con el mismo número de ciclos. Normalmente, en la mayoría de estudios se analiza un único ciclo de FIV.

Un diseño de casos-controles para este tipo de estudios acarrea la desventaja de la retrospección y la ausencia de un estimador fiable de la prevalencia de la enfermedad. Los test a estudio deberían ser, en principio, reproducibles, tanto en el laboratorio como a nivel del operador, y las variables resultado del tratamiento (respuesta ovárica y gestación) deberían ser definidas de forma clara y concisa.

La eficacia de la prueba para predecir un resultado concreto debería ser evaluada mediante tablas de contingencia a diferentes puntos de corte. Utilizando la sensibilidad y especificidad calculadas para los diferentes puntos de corte, se elabora la curva ROC, y el área bajo dicha curva representa la eficacia predictiva global de la prueba. La eficacia global representada por la curva ROC, la elección de un punto de corte, la tasa de pruebas anormales para ese punto de corte, la valoración de resultados falsos positivos y falsos negativos y las consecuencias de una prueba errónea para el manejo del paciente, contribuirán en el proceso de decidir si una prueba es útil o no.

Finalmente, sopesar el coste de realizar la prueba de forma rutinaria contra la reducción de costes mediante la exclusión de casos con pocas posibilidades de gestación, debería ayudar a la hora de aplicar o no la prueba.

2.4 LOS TEST DE RESERVA OVÁRICA EN RELACIÓN CON OTROS PREDICTORES DE ÉXITO

Es muy importante para las pacientes que consideran iniciar un tratamiento de FIV, conocer las probabilidades de éxito en una serie de ciclos de tratamiento. La posibilidad de un recién nacido vivo para cualquier pareja en tratamiento dependerá de las tasas de éxito propias de cada centro. Sin embargo, en la predicción son igualmente importantes algunas características de la pareja en tratamiento ^(102;103).

Muchos centros de FIV utilizan factores tales como la edad de la mujer, la paridad, duración de la infertilidad, respuesta al primer intento de FIV y calidad embrionaria para el aconsejar de forma individual, aunque no emplean ningún tipo de modelo predictivo formal. En este contexto, los TRO también juegan cierto papel y es la edad de la mujer el único utilizado casi sin excepción.

La pregunta entonces sería si la aplicación de otros TRO, ya sean endocrinos o ecográficos, aportarían información pronóstica a la obtenida durante el estudio inicial de esterilidad o tras el primer ciclo de FIV. Hasta la

fecha, los estudios que tratan de este tema son dudosos o no incluyen todos los factores predictivos disponibles.

Existen numerosos estudios que ofrecen un modelo basado en factores como la duración de la esterilidad, edad de la mujer, paridad, calidad espermática y test poscoital, para la predicción de recién nacido vivo entre las parejas estériles no tratadas. Sin embargo, ninguno de estos modelos incluyen los TRO, aparte de la edad. Sólo un estudio mostró que basándose en las predicciones obtenidas con el modelo de Eimers, los TRO fallaban a la hora de aportar información relevante sobre las posibilidades de una pareja de conseguir una gestación espontánea⁽¹⁰⁴⁾.

2.5 OTROS TESTS DE RESERVA OVÁRICA

Los tests de reserva ovárica (TRO) se han venido utilizando en la consulta de esterilidad, dado que la asociación de una pobre respuesta del ovario debida a una reserva disminuida, conduce a cancelaciones de los ciclos y a unas reducidas tasas de éxito en Fecundación In Vitro (FIV)⁽¹⁰⁵⁾. Aunque la fertilidad natural y las tasas de embarazo disminuyen a medida que aumenta la edad⁽⁹⁶⁾, la necesidad de los TRO fue claramente establecida cuando la edad cronológica y las características menstruales no eran fiables a la hora de predecir la edad reproductiva⁽¹⁰⁶⁾. Se han descrito numerosos modelos que relacionan de forma exacta el agotamiento de folículos primordiales en el ovario con la edad de la mujer⁽¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾.

El aspecto más importante de la reserva ovárica disminuida y la disminución asociada del potencial reproductivo es que su establecimiento es muy variable⁽¹¹⁰⁾. Además, la presencia de reglas regulares no implica la existencia de una adecuada reserva ovárica, debido a que el ovario tiene la capacidad de mantener una elevada frecuencia y número de ovulaciones a pesar del continuo declinar del número de folículos⁽¹¹¹⁾. Por tanto, el incesante agotamiento en el número y calidad de folículos puede ser descrito como un proceso dinámico, cuyos mecanismos no son conocidos en su totalidad⁽¹¹²⁾.

La mayor parte de los datos que conciernen a los TRO son limitados por la falta de datos prospectivos y controlados fuera del ámbito de la reproducción. Por tanto, hasta que se produzca la validación apropiada, no existe ningún test predictivo útil para manejar la reserva ovárica de forma fiable.

Para el análisis de las diferentes pruebas, nos basaremos en una revisión sistemática, en la que se analizan todos los estudios accesibles que tratan sobre los test de reserva ovárica disponibles en la actualidad⁽¹¹³⁾. En dicha revisión se proporciona un análisis de la curva ROC integrada para todos los estudios disponibles, así como un enjuiciamiento formal sobre la utilidad clínica de cada test.

2.5.1 Marcadores bioquímicos

2.5.1.1 FSH

La FSH sérica basal (FSHb) se considera un estimador indirecto de la reserva ovárica, y depende de la presencia de un eje hipotálamo-hipofisario intacto. Es uno de los parámetros más ampliamente utilizados para la estimación de la reserva ovárica.

Los primeros datos sobre la utilidad de las mediciones de FSHb, mostraron que la FSH predecía la respuesta del ovario y el resultado de gestación en ciclos de FIV^(114;115), y era más predictiva que la edad de la paciente⁽¹¹⁶⁾. Estudios posteriores han corroborado esto, incluyendo un gran análisis retrospectivo de pacientes de FIV en las que una FSH elevada estaba asociada con una alta tasa de abortos y de nacidos vivos independientemente de la edad⁽¹¹⁷⁾.

Sin embargo, existen numerosos estudios en la actualidad que cuestionan la capacidad predictiva de la FSHb, especialmente cuando se considera la edad de la paciente. Por ejemplo, en pacientes durante su primer ciclo de FIV, la concentración de FSHb fue un mejor predictor de cancelación que la edad, aunque la edad fue un predictor más fuerte de embarazo^(118;119). Algunos estudios sugieren que la edad joven ejerce un efecto protector sobre los efectos deletéreos de la reserva ovárica disminuida⁽¹²⁰⁾, mientras que otros revelan que no existe diferencia en resultados entre mujeres jóvenes o mayores con FSHb elevada⁽¹²¹⁾. Un estudio de cohortes retrospectivo de pacientes de FIV reveló que el aumento de edad, aunque no de FSHb, se asociaba de forma significativa con tasas de implantación y de gestación reducidas⁽¹²²⁾. En un estudio prospectivo

reciente, en mujeres con ciclos regulares con edades >40 y <40 años, con niveles elevados de FSHb en su primer ciclo de FIV, se compararon la respuesta ovárica, la tasa de gestación y la tasa de implantación. Aunque las mujeres más jóvenes con FSHb elevada tuvieron mayores tasas de cancelación, las de implantación y embarazo evolutivo fueron superiores a las del grupo de mayor edad⁽¹²³⁾.

El punto de corte para los niveles séricos de FSHb es también una cuestión a debate. En un estudio, que es único por la duración del seguimiento, la gestación evolutiva se objetivó en nada menos que el 28% de mujeres con ciclos regulares y niveles séricos de FSH de 15-20 UI/L. Solamente cuando el nivel de FSHb era mayor de 20 UI/l existía una caída clara en la tasa de gestación evolutiva independientemente de la edad⁽¹²⁴⁾.

Dado que la mayoría de datos acerca de la validez de la b-FSH para predecir la reserva ovárica provienen de estudios sobre población de FIV, es significativo que un reciente meta-análisis ha concluido que el valor de la b-FSH para predecir baja respuesta ovárica en este grupo es moderado, mientras que para la predicción de no embarazo es pobre⁽¹²⁵⁾. La información relacionada con la población general subfértile es escasa, pero un estudio de casos y controles reveló una diferencia no estadísticamente significativa en las tasas acumuladas de gestación entre pacientes con niveles elevados de FSHb y controles⁽¹²⁶⁾. Otros consideran que los niveles elevados de FSHb tienen un valor limitado en pacientes con ciclos regulares, en las que no debería llevar a una exclusión del tratamiento⁽¹²⁴⁾.

Una de las limitaciones principales de la FSH es la significativa variabilidad inter-ciclo, limitando así la utilidad de un valor normal⁽¹²⁷⁾. Otra cuestión importante es el establecer datos estandarizados a cada laboratorio individual, debido a la gran variabilidad inter-ensayo. El establecimiento de valores de corte dentro de cada laboratorio también es importante para evitar errores de interpretación de resultados, sobretodo cuando se correlacionan con resultados clínicos. Esto tiende a ocurrir sobretodo en centros en los que el volumen de pacientes es insuficiente para permitir establecer estos puntos de corte⁽¹²⁸⁾.

Es importante considerar otras causas que produzcan elevación de la b-FSH:

- Errores de laboratorio: en presencia de anticuerpos heterófilos, que pueden interferir con el inmunoensayo.

- Pulsatilidad y niveles elevados de FSH en fase folicular: en madres de gemelos dicigóticos hereditarios.

- Variantes del receptor de FSH: pueden provocar menor sensibilidad del receptor, resultando en un aumento de los niveles de FSH sin afectarse necesariamente la reserva ovárica⁽¹²⁹⁾.

La Sensibilidad de la b-FSH para detectar mujeres con baja respuesta en FIV se ha calculado que es sólo del 8%, mientras que se considera un test específico, ya que hasta un 98% de las mujeres que logran embarazo presentan cifras normales⁽¹³⁰⁾. En cuanto a su valor predictivo positivo, éste es difícil de interpretar, sobretodo en pacientes más jóvenes, donde la

prevalencia de no embarazo es menor. Por ello, existe el riesgo de sobreestimar su valor predictivo⁽¹³¹⁾.

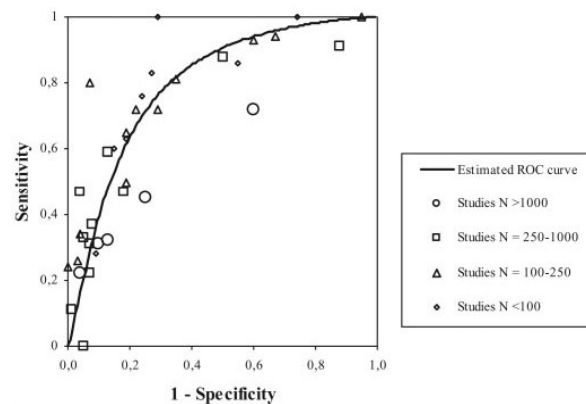


Figura 1: Curva ROC estimada de todos los estudios que ofrecen datos acerca de la capacidad de la FSH de predecir baja respuesta.

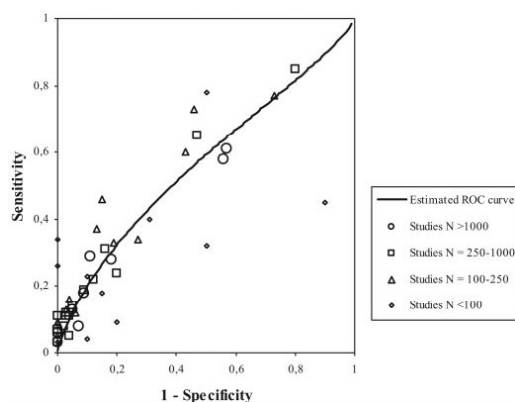


Figura 2: Curva ROC estimada y puntos de sensibilidad y especificidad de todos los estudios con datos acerca de la capacidad de la FSH de predicción de no gestación (Broekmans *et al*, 2006)

Todo esto nos lleva a la conclusión de que con el uso de la FSH basal en mujeres con ciclos regulares, la eficacia en la predicción de baja respuesta y no embarazo sólo es adecuada para puntos de corte muy elevados, pero que por el reducido número de test alterados no tendría ningún valor clínico

⁽¹¹³⁾. Considerando lo anterior, se diría que el test no es válido para la exclusión de pacientes, sino solamente como test de cribado para proponer diferentes alternativas y llevar a cabo pruebas diagnósticas adicionales, de las que un primer intento de FIV sería de elección⁽¹³²⁾.

Aparte de estas limitaciones, se han realizado muchos más estudios sobre el valor predictivo de la FSH que de ningún otro marcador. Esto, junto con la tolerabilidad del paciente y bajo coste de la técnica hace que la b-FSH sea en la actualidad uno de los test más comúnmente empleados en reserva ovárica.

2.5.1.2 Estradiol

La corta duración de la fase folicular en mujeres mayores puede deberse a un reclutamiento folicular más precoz en el día 3 del ciclo. Esta selección folicular temprana se expresa en niveles séricos de E_2 elevados⁽¹³³⁾.

Realizando una revisión sistemática acerca de este marcador, se podrían incluir unos 10 estudios que tratan sobre la capacidad predictiva y cuyos datos serían válidos para realizar un meta-análisis⁽¹³³⁻¹⁴²⁾.

Basándose en las curvas ROC integradas de todos estos estudios, se puede observar como la probabilidad de baja respuesta post-test se sitúa en torno al 50% (Sensibilidad), mientras que la posibilidad de un test positivo en bajas respondedoras es muy bajo (Valor Predictivo Positivo)⁽¹¹³⁾.

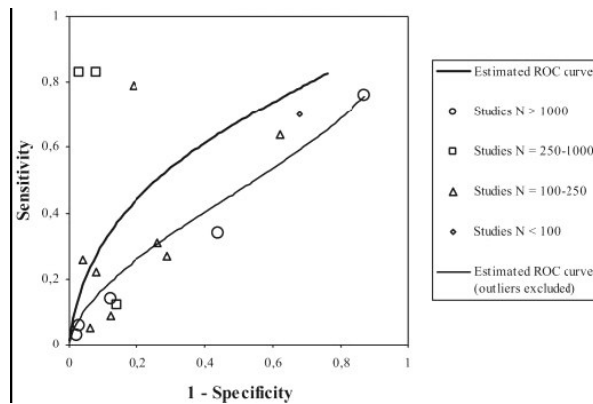


Figura 3: Curva ROC estimada de todos los estudios que aportan datos acerca de la capacidad predictiva de baja respuesta del estradiol basal (Broekmans *et al*, 2006).

En cuanto a la predicción de no embarazo, no es fácil identificar de forma clara los puntos de corte con una adecuada combinación de LR, probabilidad post-test y tasa de test anormal.

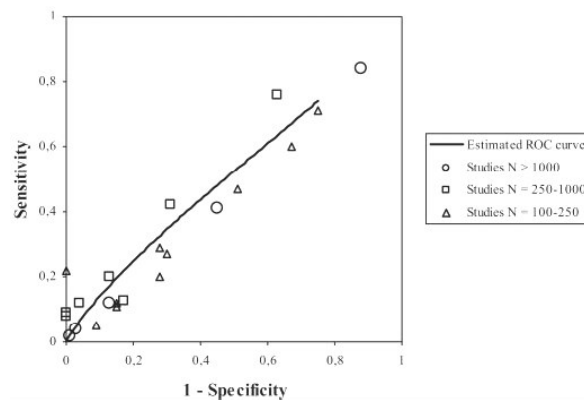


Figura 4: Curva ROC estimada, que integra los datos de los estudios que ofrecen información acerca de la capacidad del estradiol basal de predecir no gestación (Broekmans *et al*, 2006)

Todo esto nos lleva a la conclusión que la aplicación clínica del estradiol basal como prueba previa a la iniciación de un ciclo de FIV es dudosa por su pobre capacidad predictiva tanto de baja respuesta como de gestación.

2.5.1.3 Inhibina B

Las Inhibinas son glicoproteínas que pertenecen a la familia de los transforming Growth Factor beta (TGF β). Son heterodímeros constituidas por dos subunidades similares (α y β) unidas por puentes disulfuro, y segregadas por las células lúteas y de la granulosa del ovario durante el ciclo menstrual ⁽¹⁴³⁾.

Las inhibinas forman parte del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal, concretamente ejerciendo un efecto inhibitor en la síntesis y secreción hipofisaria de FSH. La Inhibina B sérica está considerada como una medida directa de reserva ovárica ya que está secretada principalmente por los folículos preantrales⁽¹⁴⁴⁾, mientras que la Inhibina A se produce durante la fase folicular en los folículos maduros y cuerpo lúteo⁽¹⁴⁵⁾.

La Inhibina B aumenta desde la fase folicular precoz para alcanzar un pico coincidiendo con la disminución de la concentración de FSH durante la fase folicular media, después disminuye durante la fase lútea aparte del pico periovulatorio, que podría representar una liberación de la inhibina B folicular del folículo roto en el torrente circulatorio^(146;147). La inhibina B también

parece haber mostrado respuesta a la administración exógena de FSH durante la fase folicular⁽¹⁴⁸⁾.

El meta-análisis que venimos comentando incluyó 9 estudios que consideraron la capacidad predictiva de la Inhibina B y que fueron aptos para la extracción de datos y posterior análisis^(119;138;139;142;149-153).

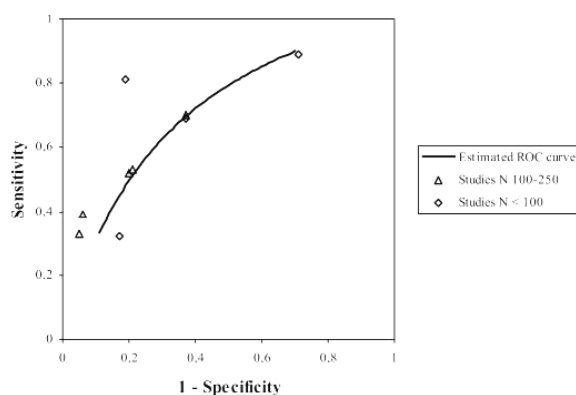


Figura 5: Curva ROC estimada, que integra los datos de todos los estudios que reportan sobre la capacidad predictiva de baja respuesta de la inhibina B (Broekmans *et al*, 2006).

En la figura 5 se puede comprobar que todos excepto un estudio se encontraron próximos a dicha curva y que un estudio aportó datos acerca de una mejor capacidad predictiva⁽¹⁵⁰⁾. Este estudio es de buena calidad, pero incluyó un número reducido de pacientes.

Con el uso de la Inhibina B en mujeres con ciclos regulares, la eficacia en la predicción de baja respuesta y no embarazo es sólo modesta para puntos de corte extremadamente bajos. Como mucho podría emplearse como cribado para guiar la estrategia a seguir y siempre como evaluación adicional

a otras pruebas diagnósticas. Aplicada de esta forma, la Inhibina B sería inferior a otras pruebas.

2.5.1.3 *Factor atenuador del pico de gonadotropinas (GnSAF).*

Cuando los ciclos de FIV estimulados con gonadotropinas estaban siendo desarrollados en los años 70 y 80, se mejoró la comprensión acerca de la fisiología de la FSH. Además de sus acciones clásicas de estímulo de la actividad aromatasa y secreción de estradiol por las células de la granulosa, se descubrió que la FSH estimulaba la producción ovárica de una hormona no caracterizada, conocida por su efecto específico en la disminución de la respuesta hipofisaria a la GnRH.

Esta hormona se ha denominado factor inhibidor del pico de gonadotropinas, con numerosas abreviaturas (GnSAF/IF, GnSIF/AF), y también atenuina. Aunque fue descrita por primera vez en los 80, el factor no ha sido caracterizado de forma convincente y no se ha publicado ninguna secuencia de aminoácidos relacionada de forma concluyente con la bioactividad del GnSAF, de ahí que no existan inmunoensayos disponibles para su determinación.

En el contexto de estudios sobre la inducción de ovulación y experimentación “in Vitro” acerca de la regulación de la LH y la GnRH, se desarrolló el concepto de que el GnSAF tiene un papel en la regulación de la

secreción de la LH, en el momento en que se produce el pico de LH y en la prevención de la luteinización precoz.

Durante una década, los estudios acerca de los efectos específicos del GnSAF en la reducción de la sensibilidad hipofisaria a al GnRH y el antagonismo de los efectos estimuladores del estradiol en la secreción de la LH inducida por la GnRH, apoyaron este concepto^(154;155). Sin embargo, el conocimiento avanzado de los cambios en la bioactividad del GnSAF en el líquido folicular y en suero, hace que sea necesaria una revisión del concepto. Martínez *et al.*, en 2002⁽¹⁵⁶⁾, demostraron que las mujeres con baja respuesta a la FSH tenían niveles disminuidos de producción de GnSAF. Las alteraciones en la respuesta del ovario a la FSH incluirían una producción disminuida de este factor, sugiriendo el posible papel del mismo como marcador de reserva ovárica. Fowler *et al.*⁽¹⁵⁷⁾ propusieron que el papel principal del GnSAF es, probablemente, la regulación negativa de la secreción de LH, principalmente durante la primera mitad de la fase folicular, indicando un papel crítico en la regulación de la foliculogénesis y la secreción de estradiol.

La principal fuente de este factor son los pequeños folículos estimulados por FSH⁽¹⁵⁸⁾. Parece existir una similitud entre el GnSAF y el extremo carboxi-terminal de la albúmina humana, de manera que la producción del factor sería el resultado de una expresión alternativa del gen de la albúmina sérica humana⁽¹⁵⁹⁾.

Debido a la inexistencia de un inmunoensayo para su determinación, no existen estudios investigando el posible papel del GnSAF como test de reserva ovárica.

2.5.2 Tests dinámicos

2.5.2.1 Test de estimulación con un agonista GnRH

Este test evalúa el cambio en la concentración sérica de estradiol desde el día 2 del ciclo hasta el día 3, tras la administración de un agonista de la GnRH, que causa un aumento temporal de la secreción hipofisaria de FSH y LH⁽¹⁶⁰⁾.

Para su revisión y meta-análisis, se incluyeron 4 estudios que incluyeron datos acerca de la capacidad predictiva del test ⁽¹⁶¹⁻¹⁶⁴⁾. Se encontraron variaciones considerables en cuanto a la definición de baja respuesta y en cuanto a la calidad de los estudios, y dado que uno de ellos no incluía los dos aspectos a estudio, fue excluido del meta-análisis.

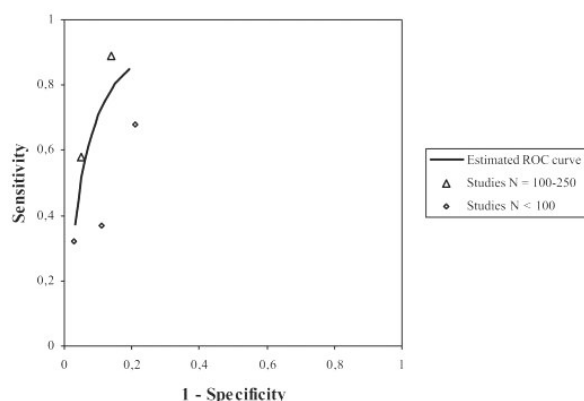


Figura 6: Curva ROC que integra los datos de los trabajos que aportan información sobre la capacidad del test de estimulación con un agonista de la Gn RH (Broekmans *et al*, 2006).

Si nos basamos en esta curva ROC integrada de los tres estudios referidos (Figura 6), para una LR de 4-5, la probabilidad posttest de baja respuesta no es superior al 50%, mientras que la probabilidad de tener dicho resultado es bastante elevada, en torno al 49%.

En cuanto a la predicción de no embarazo, el análisis muestra que se necesitan puntos de corte extremo para lograr LR moderadas de 4-5, con tasas de embarazo posttest del 5%. Estos resultados extremos se encuentran en un número muy limitado de pacientes, mientras que la elevada tasa de falsos positivos llevaría a la exclusión innecesaria de los programas de FIV, en caso de que la prueba fuese utilizada de forma diagnóstica.

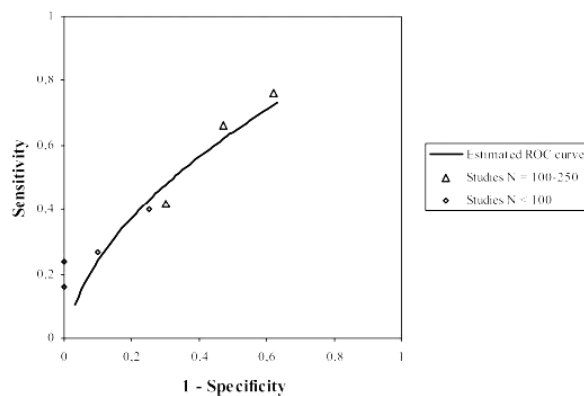


Figura 7: Curva ROC de los estudios que informan sobre la capacidad del test de estimulación con análogos de predecir no gestación (Broekmans *et al*, 2006).

Se puede concluir que con el uso del test en mujeres con ciclos regulares, la eficacia en la predicción de baja respuesta es bastante elevada y podría equipararse a la derivada del CFA. En cuanto a la predicción de no embarazo, la prueba sólo sería adecuada en puntos de corte muy bajos, con

los que sería muy difícil encontrar resultados alterados. Estos resultados se traducen en la necesidad de más investigación para la confirmación de la validez de la prueba.

2.5.2.2 Test del citrato de Clomifeno (TCC)

Descrito por Nabot y cols (1987), este test consiste en la administración de 100 mg de citrato de clomifeno en los días 5-9 del ciclo, y la determinación de las concentraciones de FSH los días 3 y 10. En mujeres con reserva ovárica normal, el aumento global de la producción de estradiol e inhibina por los folículos en desarrollo, debería ser capaz de superar el efecto antagonista del clomifeno sobre el eje hipotálamo-hipofisario, y suprimir los niveles de FSH hasta un rango normal el día 10.

El meta-análisis de Broekmans et al, incluyó 12 estudios sobre la capacidad del CCT para predecir baja respuesta y no-embarazo ^(151;165-175). En cuanto a la evaluación de la capacidad predictiva de respuesta, debido a la gran heterogeneidad para la especificidad aunque no para la sensibilidad en los diferentes estudios, no fue posible calcular un único estimador para estas características.

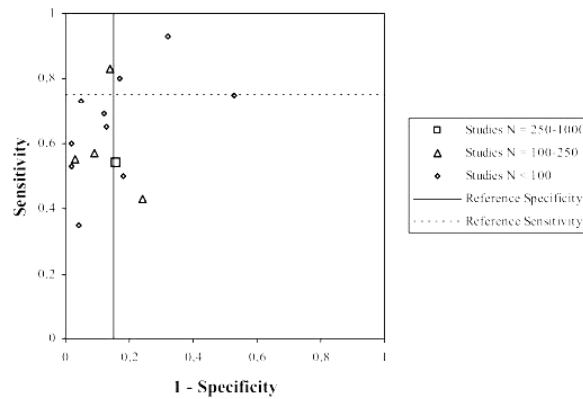


Figura 8: Puntos de sensibilidad y especificidad de los diferentes trabajos. Debido a la gran heterogeneidad no fue posible estimar una curva ROC (Broekmans *et al*, 2006).

En la figura 8 se representan las diferentes sensibilidades y especificidades en un gráfico, y se puede observar la gran heterogeneidad entre los estudios, que no parece deberse a los diferentes puntos de corte utilizados.

En cuanto a la predicción de no-embarazo pasa algo parecido, aunque en este caso ni la sensibilidad ni la especificidad fueron homogéneas entre los diferentes trabajos. Una vez más, representando las diferentes sensibilidades y especificidades en un gráfico tipo curva ROC, se comprueba que no es factible elaborar una curva representativa de todos los estudios, traducción de la gran heterogeneidad que existe entre los mismos.

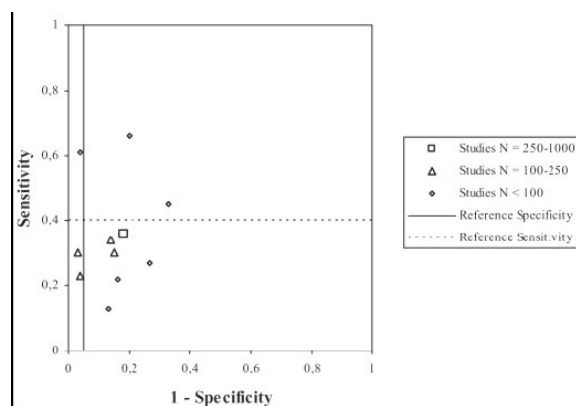


Figura 9: Puntos de Sensibilidad y especificidad de los diferentes estudios. Se puede comprobar la gran heterogeneidad existente que impide elaborar una curva ROC integradora (Broekmans *et al*, 2006).

Debido a la ausencia de una curva ROC integradora de todos los datos, no se pudieron calcular los diferentes estadísticos acerca del test.

Se considera que un test utilizado como herramienta diagnóstica para la identificación de bajas respondedoras, debería tener unos determinados niveles de sensibilidad y especificidad. Si estos niveles se establecen en torno a un 75% y 85% respectivamente, podemos ver como ninguno de los estudios reúne los criterios (Figura 8). En estudios comparativos, la validez clínica del CCT para la predicción de baja respuesta no se ha encontrado superior a la ofrecida por la FSH basal o por el CFA ^(176;177).

En cuanto a la predicción de no-embarazo, una prueba que excluya casos de iniciar un programa de FIV, debería de tener unos niveles establecidos de forma arbitraria de 40% para sensibilidad y 95% para especificidad. La gran mayoría de estudios incumplen estos criterios (Figura

9), de manera que el CCT no se considera mejor que la FSH basal o el CFA, especialmente por la pérdida de especificidad.

2.5.2.3 Test de reserva ovárica con FSH exógena (EFORT: Exogenous FSH ovarian reserve test)

Este test combina la FSHb con el aumento de estradiol tras 24 horas de la administración de una dosis estandarizada (300 UI) de FSH purificada, el día 3 del ciclo.

En el meta-análisis se incluyeron 3 trabajos en este caso ^(154;155;186), que arrojaron valores de sensibilidad para predicción de baja respuesta en torno al 80% y de especificidad que fueron desde el 60% en los trabajos de Kwee *et al.* y de Yong *et al.*, hasta el 90% en el estudio de Fanchin *et al.* En vista de estos diferentes resultados no se pudo elaborar una curva ROC integrada.

En cuanto a la predicción de no-embarazo, ninguno de los trabajos incluyó la gestación como variable resultado para el estudio de la eficacia predictiva.

Según lo expuesto anteriormente para los test de prueba, sólo un estudio reunió los criterios para sensibilidad y especificidad ⁽¹⁷⁸⁾. Este test quedaría relegado a situaciones en las que se requiere un alto nivel de detección, cuando los pacientes son excluidos del tratamiento en función de el resultado de esta prueba, debido a su baja tasa de falsos positivos.

2.5.3 Tests biofísicos

Debido a que se examina la morfología del ovario, estos tests ofrecen la oportunidad de estudiar la dinámica folicular de forma directa, y por ello se consideran medidores directos de la reserva ovárica. Se podría pensar que el número de folículos restantes en el ovario se relaciona con la fertilidad o la probabilidad de entrar en la menopausia⁽¹⁷⁹⁾.

2.5.3.1 Volumen ovárico

El ovario humano es un órgano dinámico, que cambia de tamaño y actividad a lo largo de la vida. El volumen medio del ovario aumenta desde 0,7 cm³ a los 10 años de edad, hasta 5,8 cm³ a los 17 años⁽¹⁸⁰⁾. Aunque los datos sobre volumen ovárico en mujeres normales fértiles son limitados, algunos estudios sugieren que no existen grandes cambios en el volumen del ovario durante el periodo reproductivo en mujeres individuales hasta el periodo pre-menopáusico^(181;182).

Se ha visto que el tamaño del ovario disminuye en mujeres mayores de 40 años, lo que no parece verse afectada por la paridad⁽¹⁸³⁾. Tras la menopausia, los ovarios encogen con una pronunciada caída en su volumen, disminución que progresa con cada década de vida⁽¹⁸⁴⁾.

En el meta-análisis realizado por Broekmans *et al.*, se incluyeron 10 trabajos con disponibilidad de datos acerca de la capacidad predictiva de la prueba ^(138;151;185-190), aunque dos de ellos no incluyeron datos acerca de la

eficacia predictiva de gestación ^(150;191). Casi la mitad de los estudios presentaban sesgos de selección. En tres de los trabajos, las mujeres fueron seleccionadas según los niveles de FSH ^(151;187;189), y el de Lass *et al.* sólo incluyó pacientes con menos de 36 años y con niveles de FSH<15 UI/L.

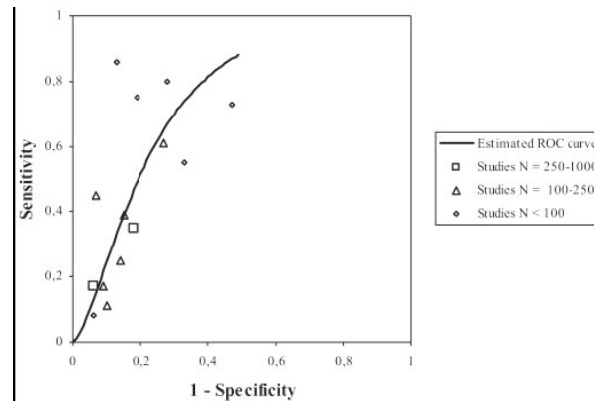


Figura 10: Curva ROC que integra los datos de todos los estudios que informan sobre la capacidad predictiva de baja respuesta del volumen ovárico (Broekmans *et al*, 2006).

Si nos fijamos en la figura 10, vemos que el volumen ovárico tiene una eficacia predictiva global modesta.

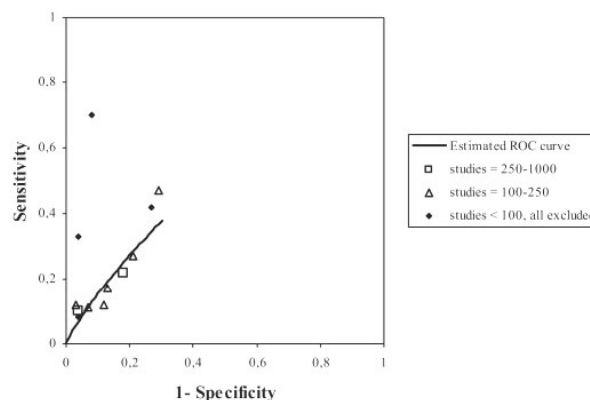


Figura 11: Curva ROC integradora de todos los estudios que aportan información sobre la capacidad predictiva de no gestación del volumen ovárico (Broekmans *et al*, 2006).

En cuanto a la predicción de no-embarazo, la curva ROC representativa (Figura 11) de todos los estudios disponibles nos muestra que la eficacia predictiva global no es buena para pacientes de FIV, incluso si se utilizan puntos de corte muy bajos.

Debido a la elevada tasa de falsos positivos que se derivan de esta prueba, que no es aceptable desde el momento en que un resultado positivo excluiría a pacientes del tratamiento, se considera que el Volumen Ovárico no es un test adecuado para el manejo de la reserva ovárica.

2.5.3.2 Contaje de Folículos Antrales (CFA)

Desde que se describió por primera vez⁽¹⁹²⁾ la relación entre el aumento de edad y la disminución del CFA, han existido múltiples intentos para establecer la relación entre la reserva ovárica y el CFA. Se asume que el número de folículos antrales originados desde la cohorte de folículos en crecimiento, también se correlaciona con el número de folículos primordiales, o la reserva ovárica⁽¹⁹³⁾. El CFA se define normalmente como el número de folículos <10 mm de diámetro detectados por ecografía durante la fase folicular temprana.

Se incluyeron 15 estudios para realizar el meta-análisis y estudiar la capacidad predictiva del test^(138;150;187-189;194-203). En el análisis de predicción de baja respuesta se encontró que para una LR positiva de 8, la probabilidad posttest de repuesta pobre se acercaba al 70%, considerando la probabilidad

pretest alrededor del 20%. Este resultado es lo suficientemente alto para considerar el CFA como un test clínicamente válido para la predicción de baja respuesta.

En cuanto a la predicción de no-embarazo, se objetivó que para conseguir LR de 4-5, se necesitaban CFA muy bajos, lo que llevaba a una tasa de gestación posttest de un 5%, tomando como probabilidad pretest el 20%, situación que se da en un porcentaje de pacientes muy bajo.

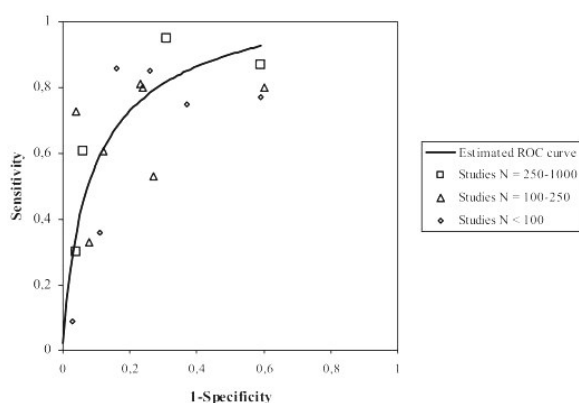


Figura 12: Curva ROC que integra todos los estudios que aportan datos acerca de la capacidad predictiva de baja respuesta del CFA (Broekmans *et al*, 2006).

Se puede concluir que el CFA no es adecuado para la predicción de embarazo. Sin embargo, sí se considera válido para el screening de baja respuesta, y para reorientar el primer intento de FIV como etapa diagnóstica más avanzada, que aportará datos adicionales acerca de la reserva ovárica

2.5.3.3 Flujo vascular ovárico

En la revisión sistemática se incluyeron 7 estudios ^(189;205-210). En estos estudios, el flujo ovárico se calculó el día 3 del ciclo, o bien tras conseguir la supresión hipofisaria con un agonista de la GnRH, previa a la estimulación ovárica ⁽¹⁸⁹⁾. Debido a que solamente el estudio llevado a cabo por Kupesic *et al.* en 2003 permitió elaborar una tabla de contingencia 2x2, relacionando el resultado del test con la existencia o no de embarazo y con la baja o normorespuesta, no se pudo realizar un meta-análisis formal.

Además, los trabajos emplearon predictores derivados del flujo ovárico muy diferentes para su análisis (pico máximo de velocidad sistólica, flujo sanguíneo del estroma ovárico obtenido por ecografía 3D, existencia de flujo sanguíneo o no ⁽²²⁹⁾...), los criterios de selección de pacientes fueron diferentes (algunos incluyeron pacientes estériles con FSH>10 mientras que otros no).

Los resultados obtenidos de los estudios existentes en la actualidad sobre este marcador son contradictorios, de manera que fuera del campo de la investigación no se considera el uso rutinario del test en la evaluación de la reserva ovárica.

2.5.3.4 Biopsia ovárica

La reserva ovárica depende del número de folículos primordiales existentes en la corteza del ovario, lo que sugiere que la manera obvia de

estimarla es midiendo la densidad folicular en una biopsia ovárica^(230;231). Se han llevado a cabo intentos para cuantificar los folículos antrales pequeños en muestras de ovario obtenidas por laparoscopia⁽²¹¹⁾ y había una clara reducción de la densidad folicular dependiente de la edad. Las mujeres por encima de los 35 años tenían sólo el 30% de la cantidad presente en mujeres más jóvenes. El número de folículos por unidad de volumen fue utilizado para estimar el total y se sugirió que podía ser empleado potencialmente de forma individual.

Más tarde se comprobó que la densidad folicular en una pieza de ovario no tenía por qué representar de forma adecuada la densidad del ovario entero⁽²¹²⁾, y que ésta variaba enormemente entre porciones muy pequeñas de la corteza ovárica. Esto nos lleva a calificar de totalmente irrelevante la información proporcionada por una muestra de ovario, independientemente de su tamaño, localización, y número de biopsias tomadas⁽²¹³⁻²¹⁶⁾.

La consecuencia es que si la prueba, que es invasiva y tiene el riesgo potencial de producir adherencias y otras complicaciones posquirúrgicas, no aporta información válida, no debería emplearse para medir la reserva ovárica. Su uso entonces debería quedar relegado al ámbito de la investigación clínica.

En cuanto a la revisión sistemática, no se encontró ningún estudio publicado que evaluase la capacidad predictiva de los resultados de FIV, en términos de respuesta ovárica y tasas de embarazo.

2.5.4 Modelos multivariantes

Se identificaron 9 estudios con datos acerca de la capacidad de predicción de diferentes modelos multivariantes mediante la estrategia de búsqueda y selección^(119;138;151-153;162;203;217;218). Ninguno de estos estudios multifactoriales recogió información acerca de la predicción de embarazo.

Debido a la gran heterogenicidad de especificidades y sensibilidades no fue posible construir una curva ROC integrada, lo que dificultó enormemente el análisis de la capacidad predictiva de baja respuesta. Considerando que un test de prueba utilizado como herramienta diagnóstica para identificar bajas respondedoras debe tener unos niveles mínimos de 75% para la sensibilidad y 85% para especificidad, se comprobó que sólo unos de los estudios cumplía estos criterios⁽¹³⁸⁾. De estos datos se puede concluir que los modelos multivariantes, comparados con otros TRO, no constituyen una mejoría de la capacidad predictiva.

2.6 AMH COMO MARCADOR DE RESERVA OVÁRICA: REVISIÓN DEL ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

La investigación clínica de la AMH como marcador de función ovárica comenzó tras el descubrimiento en 1999 de que los ratones AMH-null nacen con un número normal de folículos primordiales pero tienen un decaimiento acelerado de su pool. Los investigadores clínicos que siguieron este descubrimiento, han investigado la AMH sérica en múltiples diseños de estudios, utilizando diferentes poblaciones y diferentes kits de ELISA para AMH.

Hay algunos estudios que estudiaron la AMH en la población general de mujeres fértiles, pero la gran mayoría han sido en mujeres con una historia conocida de infertilidad que están en tratamiento de inducción de ovulación para reproducción asistida.

La primera publicación acerca de la asociación de los niveles séricos de AMH en fase folicular precoz y la respuesta ovárica fue realizada por Seifer *et al.* en 2002 ⁽²¹⁹⁾. El análisis retrospectivo de 107 mujeres sometidas a tratamiento de inducción de ovulación para FIV/ ICSI demostró niveles séricos de AMH 2,5 veces mayores en mujeres en las que se recuperaban más de 11 ovocitos en la punción folicular (2,5 ng/ml), comparado con aquellas en las que se obtenían 6 o menos (1 ng/ml). La edad media de las pacientes en este estudio fue de 35 años. Por tanto, mayores concentraciones séricas de AMH en fase folicular precoz se relacionaron con un mayor número de ovocitos recuperados en la punción.

Este trabajo fue corroborado por otro estudio prospectivo llevado a cabo por van Rooij *et al.* ⁽²¹⁸⁾, donde observaron que los niveles de AMH estaban altamente correlacionados con el número de folículos antrales y el número de ovocitos recuperados en 130 mujeres, con edad media de 34 años, en tratamiento de inducción de ovulación para FIV. Un análisis ROC mostró que la capacidad de predicción de la AMH y del CFA de baja respuesta (< 4 ovocitos) era similar. Los investigadores concluyeron que la baja respuesta en FIV, indicativa de reserva ovárica disminuida, se relacionaba con niveles séricos de AMH más bajos.

Fanchin *et al.* ⁽²²⁰⁾ continuaron con un estudio prospectivo en el que comparaban los niveles basales de AMH en fase folicular precoz con aquellos de inhibina B, FSH y Estradiol en 75 mujeres, con una edad media de 34 años, en tratamiento de inducción de ovulación para FIV. Empleando ecografía de alta resolución encontraron que la correlación entre la FSH ($r=-0,29$), Estradiol e inhibina B ($r=0,29$) y el CFA era débil. Sin embargo encontraron una correlación fuerte estadísticamente significativa entre los niveles de AMH y el CFA ($r=0,74$; $p<0,001$). Los autores sugirieron que los niveles de AMH reflejarían mejor el status folicular que los marcadores hormonales convencionales, como la FSH, inhibina B y el Estradiol. Muttukrishna *et al.* en un estudio retrospectivo ⁽²²¹⁾ y otro prospectivo ⁽²¹⁷⁾, encontraron la AMH como el marcador aislado más útil y con la mejor asociación con el número de folículos y el número de ovocitos recuperados así como predictor de baja respuesta utilizando como punto de corte 0,2 ng/ml basándose en el análisis ROC.

En otro trabajo, Fanchin *et al.*⁽²²²⁾ demostraron que durante la inducción de ovulación existe una caída en la concentración de AMH, en oposición al aumento de E₂ e inhibina B, lo que va en consonancia con la disminución de folículos preantrales que pasan a ser folículos preovulatorios más grandes. Esto es consistente con inmunotinciones previas del ovario humano que mostraron que la mayor producción de AMH proviene de las células de granulosa de los folículos preantrales pequeños (2-6 mm), con una menor producción en los folículos mayores de 6-8 mm⁽⁸¹⁾. Esto también concuerda con un estudio más reciente que demuestra que las concentraciones de AMH son de 2 a 3 veces mayores en el líquido folicular de los pequeños folículos de 3-8 mm comparadas con las de los grandes folículos preovulatorios⁽²²³⁾.

Hay cuatro estudios que hayan estudiado la capacidad predictiva de gestación de la AMH. Dos de ellos apoyan la asociación de la hormona con el embarazo y los otros dos no, pero sí demuestran asociación entre el marcador y la respuesta del ovario.

Hazout *et al.*⁽²²⁴⁾ analizaron de forma retrospectiva, muestras séricas consecutivas recogidas un día 3 del ciclo, en 109 mujeres menores de 42 años, edad media de 33, que estaban en tratamiento de inducción de ovulación para FIV. Los valores séricos medios para embarazo clínico (actividad cardíaca objetivable por ecografía transvaginal) fueron más del doble de los de las mujeres que no lograron gestación (2,4 ng/ml vs. 1,1 ng/ml, respectivamente). El análisis multivariante reveló que la AMH del día

3 constituía la mayor contribución independiente en la predicción de embarazo. Otras variables de resultado en FIV, como el número de ovocitos recuperado y el número y calidad de embriones obtenidos también estaban asociados con mayores niveles de AMH, a pesar de presentar niveles similares de FSH, inhibina B y estradiol en fase folicular precoz.

Eldar-Geva *et al.*⁽²²⁵⁾ estudiaron prospectivamente 56 mujeres menores de 38 años (edad media de 30 años), con FSH basal normal (<10 UI/L), determinando la AMH, Estradiol e inhibina B séricas antes y 24 horas después de la administración de 300 UI FSH recombinante en los días 3-4 del ciclo y durante la fase lútea. Objetivaron que solamente los niveles de AMH en fase lútea eran predictores de gestación evolutiva.

Peñarrubia *et al.*⁽²²⁶⁾ estudiaron retrospectivamente 80 pacientes, con edad media de 35 años, durante su primer ciclo de FIV/ICSI, para determinar si los niveles basales de AMH del día 3 del ciclo y los niveles de AMH 5 días tras el tratamiento con gonadotropinas predecían la respuesta ovárica y la gestación. En este trabajo, tanto los niveles basales como los del día 5 eran significativamente menores en las pacientes canceladas que en las que se finalizaba el ciclo. Un análisis ROC mostró como los niveles de AMH determinados el día 5 del tratamiento con gonadotropinas eran un mejor predictor de respuesta que los niveles basales. Sin embargo, vieron que la hormona no era buena para predecir gestación.

Ficicioglu *et al.*⁽²²⁷⁾ estudiaron de forma prospectiva 50 mujeres en tratamiento de FIV con una edad media de 31 años. Los niveles séricos medios de AMH en las mujeres con 5 o más ovocitos recuperados fueron significativamente mayores que aquellos de la mujeres en las que se recuperaron menos de 5. El número de ovocitos maduros, el CFA y los niveles máximos de Estradiol fueron mayores en las mujeres con niveles de AMH más elevados, a pesar de la edad y FSB y E₂ basales similares. El indicador de ovocitos recuperados más sensible y específico fue la AMH, seguido por el CFA y la edad. Sin embargo, el análisis estadístico no apoyó que la AMH fuese predictiva de gestación, definida como una β -hCG positiva.

Aunque estos dos estudios no demuestran que la AMH sea predictiva de gestación^(226;227), hay otros estudios que demuestran mejor calidad de los ovocitos recuperados⁽²²⁸⁾ y mejor calidad de los embriones obtenidos para la transferencia⁽²²⁹⁾ asociada con los niveles de AMH. Ebner *et al.*⁽²²⁸⁾ examinaron prospectivamente ovocitos de 141 mujeres en tratamiento de de ICSI y observaron la asociación entre mayores niveles de AMH y una mejor morfología de los ovocitos. Los ovocitos fueron clasificados por anomalías que incluyeron granulación central del citoplasma, inclusiones oscuras, vacuolas, agregación del retículo endoplásmico liso y granularidad del espacio perivitelino. La tasa de cancelación se correlacionó con los niveles de AMH, y la mejor calidad de los ovocitos con unos niveles medios de AMH (1,66 – 4,52 ng/ml) comparados con los de las mujeres con niveles <1,66

ng/ml y >4,52 ng/ml. La fecundación y el clivaje al estado de blastocisto no se vieron influenciados por los niveles de AMH.

Silberstein *et al.*⁽²²⁹⁾ encontraron embriones con mejor morfología y clivaje en mujeres con niveles de AMH medios mayores de 2,7 ng/ml que por debajo de ese punto de corte. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la AMH fue determinada el día de la administración de hCG y no en fase folicular precoz. Más recientemente, Smeenk *et al.*⁽²³⁰⁾ utilizando un análisis multivariante, encontraron asociación entre los niveles de AMH y el número de ovocitos y de embriones obtenidos, pero no con la calidad de los mismos ni con la tasa de gestación.

Gnoth T *et al.*⁽²³¹⁾, incluyeron 316 pacientes que iniciaban su tratamiento de FIV/ICSI de forma prospectiva. Se compararon los niveles de AMH, FSH, inhibina B y edad y sus capacidades predictivas de respuesta ovárica y gestación clínica. Establecieron un punto de corte de AMH de $\leq 1,26$ ng/ml para detectar bajas respondedoras (4 ovocitos o menos), con una sensibilidad del 97%. Con niveles inferiores a 0,5 ng/ml fue posible una correcta predicción de baja respuesta en un 88%. Sin embargo, niveles de AMH superiores a 0,5 ng/ml no se correlacionaron de forma significativa con la gestación clínica. Concluyeron que la AMH es un buen predictor de respuesta, y es útil para el screening, Unos niveles $\leq 1,26$ ng/ml son altamente predictivos de baja respuesta y deberían ser confirmados por un CFA de segunda línea. Aunque ayuda a tomar decisiones, de forma aislada no constituye un predictor adecuado de éxito en la FIV.

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO/ OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

El papel de la AMH como señal intra-ovárica del tamaño del pool de folículos en crecimiento aporta un gran beneficio en la práctica clínica. Uno de los factores más importantes en una consulta de esterilidad es la cantidad y calidad de folículos primordiales, que es lo que conocemos como *reserva ovárica*.

El envejecimiento ovárico supone la disminución de la reserva ovárica con la edad. Además de los parámetros como calidad ovocitaria, el número de folículos primordiales es un determinante fundamental de la reserva del ovario, aunque es difícil de medir⁽⁹⁶⁾. Sin embargo, el número de folículos en crecimiento se correlaciona con el tamaño del stock de folículos primordiales⁽¹⁹³⁾, y un marcador que refleja todos los folículos que han hecho la transición desde el pool de folículos primordiales al pool de folículos en crecimiento sería un buen marcador indirecto de los aspectos cuantitativos de la reserva ovárica.

Como hemos visto anteriormente, ninguno de los marcadores empleados en la actualidad define de forma exacta la RO, prediciendo la respuesta del ovario a la estimulación con gonadotropinas exógenas, y mucho menos la gestación.

Dado que la AMH se produce en las células de la granulosa folículos antrales en crecimiento en el ovario humano a partir del estadio de selección⁽²³²⁾, serviría como marcador sérico de reserva ovárica.

Ante la necesidad de clasificar a nuestras pacientes de forma correcta antes del tratamiento, para planificar el esquema a utilizar, o bien para aconsejar el no iniciarlo, o recomendar otro tipo de técnicas como la donación de ovocitos, planteamos el papel de la AMH como marcador superior a los actualmente utilizados, a la hora de predecir la respuesta del ovario y la gestación, y por tanto a la hora de definir la reserva ovárica. Además, obtendríamos ciertos beneficios que nos ofrece la hormona frente a otros marcadores.

3.2 OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es evaluar el papel de la determinación de los niveles séricos de AMH en fase folicular temprana a las pacientes que entran en programa de FIV/ICSI, como test predictivo de reserva ovárica. Para ello tratamos de estudiar la capacidad predictiva de baja respuesta.

Otros objetivos secundarios son:

- Encontrar un punto de corte de AMH para nuestras poblaciones con Sensibilidad y Especificidad adecuadas para la predicción de baja respuesta.
- Evaluar la capacidad de la AMH de predecir gestación, y compararla con la capacidad de predicción de baja respuesta.

- Comparar el poder predictivo de la AMH frente al del CFA en nuestra población a estudio, ya que se considera un referente válido a la hora de predecir baja respuesta⁽¹¹³⁾.
- Comparar el poder predictivo de la AMH con el de la FSH, que es un marcador ampliamente utilizado de forma clásica para el estudio de las pacientes estériles a la hora de planificar el tratamiento de inducción de ovulación.
- Evaluar la utilidad de asociar los tres marcadores en diferentes combinaciones en la predicción, para así planificar de forma más adecuada el tratamiento de inducción de ovulación más apropiado para cada paciente y mejorar con ello las tasas de éxito.
- Evaluar el valor clínico de la prueba y comprobar si con su aplicación cambiaría el manejo práctico de las pacientes, los costes del diagnóstico-tratamiento, la seguridad o las tasas de éxito.
- Validar el test para su uso en nuestra práctica clínica diaria.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron de forma prospectiva 114 pacientes del área 5 de Madrid que acudieron a la consulta de esterilidad para iniciar su primer ciclo de FIV/ICSI entre Enero 2004 y Enero de 2006. Todas ellas tenían historia de un mínimo de 2 años de esterilidad, ya que es el período mínimo de tiempo que transcurre desde que la paciente es remitida a consulta por esterilidad y es llamada de la lista de espera para FIV/ICSI. Los criterios de inclusión fueron:

- 1) Ciclos menstruales regulares
- 2) Presencia de ambos ovarios
- 3) Sin evidencia de alteraciones endocrinas (TSH, Prolactina, Testosterona y Androstendiona normales)
- 4) Edad ≤ 40 años

A todas las participantes y sus parejas se les realizó un estudio básico de esterilidad según el protocolo del servicio, para conocer la causa de la misma así como para indicar el tipo de técnica de reproducción asistida ideal para cada pareja. Todas las pacientes recibieron una hoja informativa acerca del estudio, con la posibilidad de rechazar su participación (ver apéndice).

Las principales indicaciones para las técnicas de reproducción asistida fueron: esterilidad masculina (27%), tubárica (31%), esterilidad de origen desconocido (29,5%) con al menos 3 intentos de Inseminación intrauterina fallidos, endometriosis (13%) y esterilidad mixta (4,1%).

El día 3 de un ciclo espontáneo dentro de los tres meses previos al tratamiento de FIV se procedió a la determinación sérica mediante venopunción de Estradiol (E_2), FSH y hormona Anti-mülleriana (AMH). Asimismo, se realizó la medida del número de folículos ováricos antrales (2-5 mm de diámetro) medidos por ecografía transvaginal el día 2 o 3 del ciclo, según lo descrito con anterioridad.

Debido a que las muestras sanguíneas se almacenaron (-20°C) para un análisis más económico, que se realizaba cuando se acumulaban 40 muestras, la capacidad de cada kit de determinación de Anti-mülleriana, los niveles hormonales no se conocían en el momento de iniciar la estimulación. Esto supuso que el tipo de estimulación fuese elegida en función del conteo de folículos antrales, de los niveles de FSH y de la edad. El volumen total de pacientes con determinación de AMH fue bastante mayor que el total de pacientes incluidas en el estudio, pero nosotros solamente incluimos en el análisis a aquellas con protocolo largo de desensibilización con análogos de GnRh y estimulación con 150 UI iniciales de FSH, ajustadas tras el primer control ecográfico y de estradiol sérico.

Las determinaciones de laboratorio, a cargo del Servicio de Bioquímica se realizaron según técnicas de enzimoimmunoanálisis (AMH: kit de Diagnostic System Laboratorios, Inc./Beckman Coulter, Marseille, France; FSH: Modular de Roche; E_2 : AxSYM immunoanalyser de Abbott Laboratorios, Abbott Park, IL, USA).

El protocolo de inducción de ovulación en estas pacientes, en resumen, se lleva a cabo con desensibilización hipofisaria con 0.05 mg diarios de triptorelina acetato (Decapeptyl ®, Ipsen Pharma), comenzando en fase lútea media. Tras la menstruación, la estimulación ovárica se llevó a cabo con una dosis fija de 150 UI de FSH (Puregon ®, Organon). Después de 7 días se evaluó el crecimiento folicular mediante ecografía y determinación sérica de Estradiol, ajustando la dosis de FSH si se consideraba necesario. Cuando existió desarrollo de al menos 3 folículos ovulatorios (~20mm), se administran 10000 UI de hCG (Ovitrelle®, Serono), procediendo 36 horas después a la recuperación ovocitaria mediante punción folicular. Se transfirieron un máximo de dos embriones y el soporte de fase lútea se realiza con Progesterona micronizada (Utrogestan ®, Seid).

La variable de resultado principal se considera la respuesta del ovario a la estimulación con gonadotropinas exógenas, cuantificada por el número de ovocitos recuperados en la punción folicular. Definimos *baja respuesta* como la recuperación de menos de 4 ovocitos en la captación, según la definición realizada por algunos autores^(120;121;138;233-235), o la cancelación del ciclo debido al desarrollo de menos de 3 folículos durante la estimulación ovárica controlada. En el análisis de baja respuesta, las pacientes con respuesta exagerada se incluyeron dentro del grupo de normorrespuesta a la hora de compararlas.

La gestación definida por β -hCG positiva en orina a las 3 semanas de la transferencia la hemos considerado una variable de resultado secundaria.

En el análisis de gestación, las pacientes con ciclos cancelados no han sido incluidas en el cálculo, porque no se puede excluir que estas pacientes lograsen embarazo en caso de que se les llegase a realizar una FIV/ICSI. Las pacientes con ausencia de desarrollo folicular o con Estradiol <200 pg/L si que se incluirían en el cálculo, porque su probabilidad de embarazo se considera cero.

Los datos, que se recogen en la base de datos utilizada de forma habitual en el servicio, se analizan mediante el programa SPSS (Statistical Program for Social Sciences). La correlación entre distintas variables las hemos estudiado empleando el coeficiente de correlación (Rho) de Spearman. Para la comparación de los datos clínicos o demográficos entre los grupos de baja respuesta y repuesta normal se ha utilizado la *t* de student, la *U* de Mann-Whitney o el test Chi-cuadrado según estuviese indicado.

Para el cálculo de la capacidad de discriminación de pacientes con baja respuesta y de no gestación se ha utilizado el análisis de la curva ROC (Receiver Operating Characteristic) (siendo las variables dependientes la respuesta ovárica representada por el número de ovocitos y la gestación), a través del área bajo la curva (AUC) . Este área puede variar entre 0,5 (sin poder discriminativo) y 1,0 (discriminación perfecta). También hemos utilizado las coordenadas de la curva ROC de la AMH para baja respuesta, para calcular el punto de corte que presenta mejor sensibilidad y especificidad en nuestra muestra, para disminuir así la tasa de falsos positivos y falsos negativos.

Se generaron modelos de regresión logística bi- y multivariante para determinar si los diferentes tests que hemos estudiado podían ser considerados como factores pronóstico de baja respuesta. De este modo se ofrece la OR ajustada, para los tests de forma aislada y para diferentes modelos multivariantes.

La significación estadística la establecemos para valores de $p < 0,05$.

A todas las pacientes se les entregó una hoja informativa sobre el estudio, así como un consentimiento informado para la participación en el trabajo (ver apéndice).

5. RESULTADOS

De las 130 pacientes incluidas inicialmente, 8 abandonaron antes del tratamiento de FIV, la mayoría por acudir a centros privados y por gestaciones espontáneas. De 4 pacientes no se pudieron determinar los niveles de AMH debido a la ausencia de suero congelado, y de otras 4 no se reflejaron el número de ovocitos recogidos en la base de datos del servicio. Dado que este dato constituye la variable de resultado principal, y es básica a la hora de dividir las pacientes en los dos grupos de estudio, optamos por excluirlas del análisis. Por tanto, finalmente incluimos 114 pacientes en el análisis, de los que a 64 (56,6%) se les realizó una FIV convencional, a 44 (38,5%) una microinyección intracitoplasmática (ICSI) y a 6 (4,9%) ambas técnicas (**Figura 1**).

Hubo 5 pacientes cuyos ciclos fueron cancelados por baja respuesta (≤ 3 folículos), que también fueron incluidas en el análisis de respuesta ovárica, aunque no en el de gestación, porque no sabemos que habría pasado en caso de haber llegado a finalizar el ciclo. No tuvimos ninguna paciente con ausencia de desarrollo folicular o con niveles de estradiol menores de 200 pg/L.

La edad media de nuestra población a estudio fue de 33,39 años (rango 25-39 años) y las causas de esterilidad por las que consultaron fueron

(**Figura 2**):

- Masculina 28%
- Tubárica 26,3%

- Esterilidad de Origen Desconocido 30,5%, con al menos 4 inseminaciones intrauterinas fallidas previas.
- Endometriosis 11%
- Mixta 4,2%

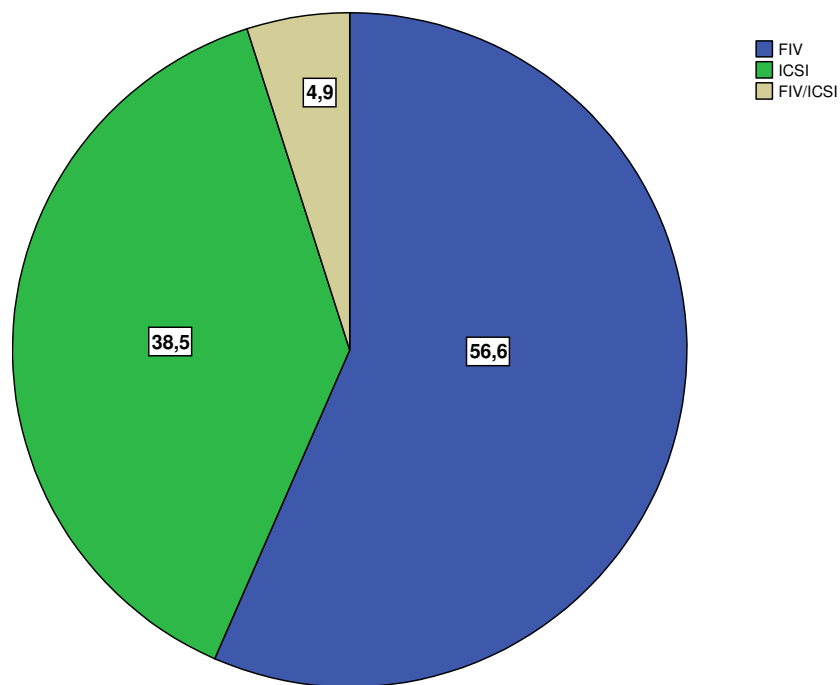


Figura 1: Tipo de técnica de fecundación (%): FIV, ICSI, FIV/ICSI.

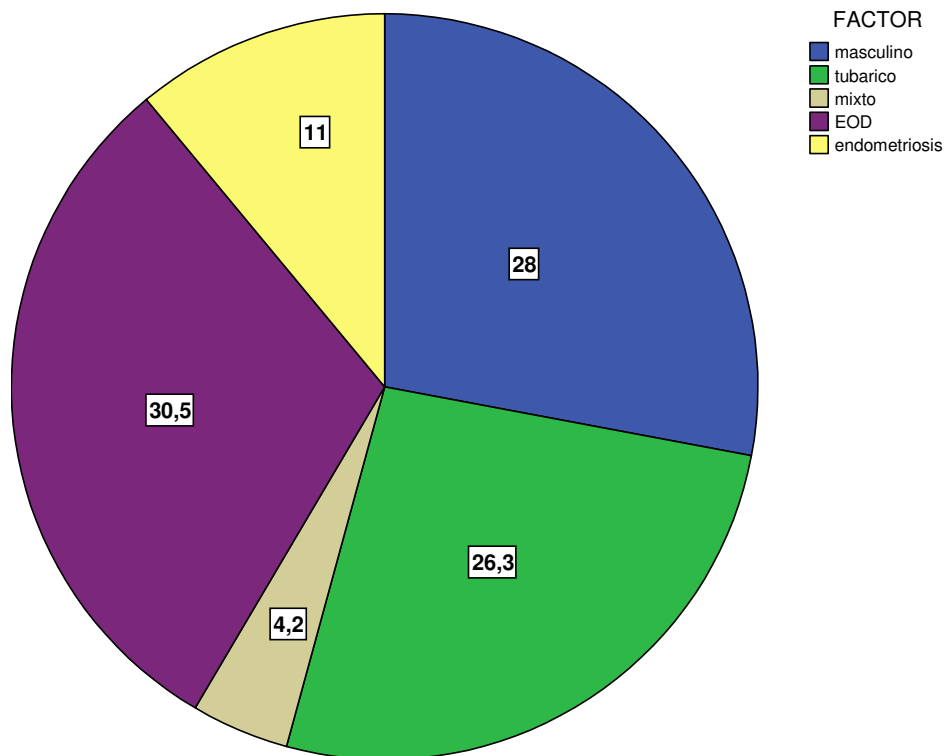


Figura 2: Causas de esterilidad de las 114 pacientes incluidas en el estudio (%).

La media de AMH en suero en fase folicular precoz fue de $3,99 \pm 2,77$ ng/ml, con valores que van desde niveles indetectables (0,00) hasta 13,40 ng/ml. Como se puede observar en el histograma, la mayor parte de pacientes presentaron niveles de AMH entre 0 y 5,0 ng/ml, siendo los valores extremos por encima de 10 poco frecuentes (**Figura 3**).

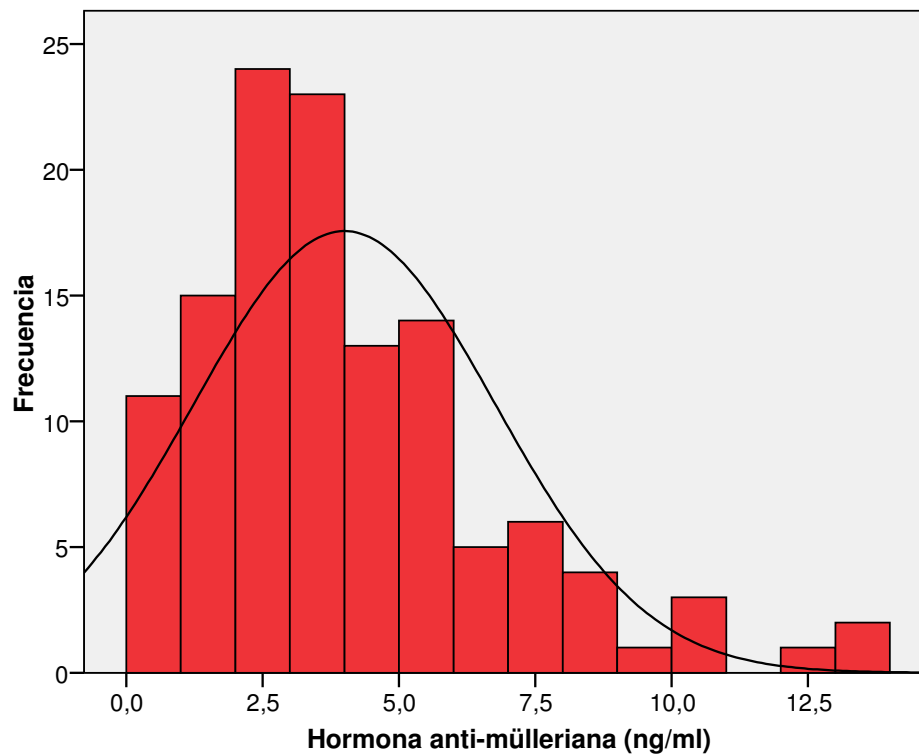


Figura 3: Distribución de los valores de AMH de nuestra muestra.

Respecto al resto de marcadores de reserva ovárica incluidos en nuestro trabajo, hemos encontrado los siguientes valores descriptivos de tendencia central (media y mediana) y variabilidad (desviación típica, rango y cuarteles) reflejados en la tabla 1.

Tabla 1 : Estadísticos descriptivos de tendencia central y variabilidad para la FSH basal, Estradiol basal y el Contaje de Folículos Antrales.

ESTADÍSTICO	FSH basal (UI/L)	Estradiol basal (pg/L)	Contaje Folículos Antrales
Media	8,45	59,20	8,86
Mediana	7,75	56,00	7,00
Desviación típica	3,53	32,44	5,08
Mínimo	1,80	10,00	1,00
Máximo	32,00	250,0	30,00
Percentiles			
25	6,80	37,00	6,00
50	7,75	56,00	7,00
75	9,00	73,00	1,00

La tasa de gestación por ciclo realizado fue de 37,4%, excluyendo para el análisis, por tanto, los ciclos cancelados (**Figura 4**).

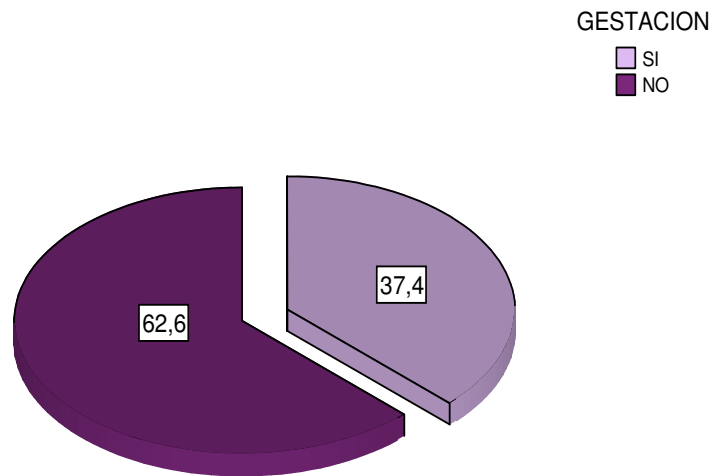


Figura 4: Tasa de gestación por ciclo.

Las correlaciones entre los niveles séricos de AMH y otros marcadores mostraron una relación inversa estadísticamente significativa con los niveles de FSH basal ($r=-0,326$; $P<0,05$) y con la dosis total de FSH utilizada en la estimulación ($r=-0,380$; $P<0,05$). También fue significativa la correlación entre la FSH basal y el CFA ($R=-0,467$; $P<0,05$).

No hemos encontrado relación entre el estradiol basal y la AMH ($R=-0,032$; $P=0,731$).

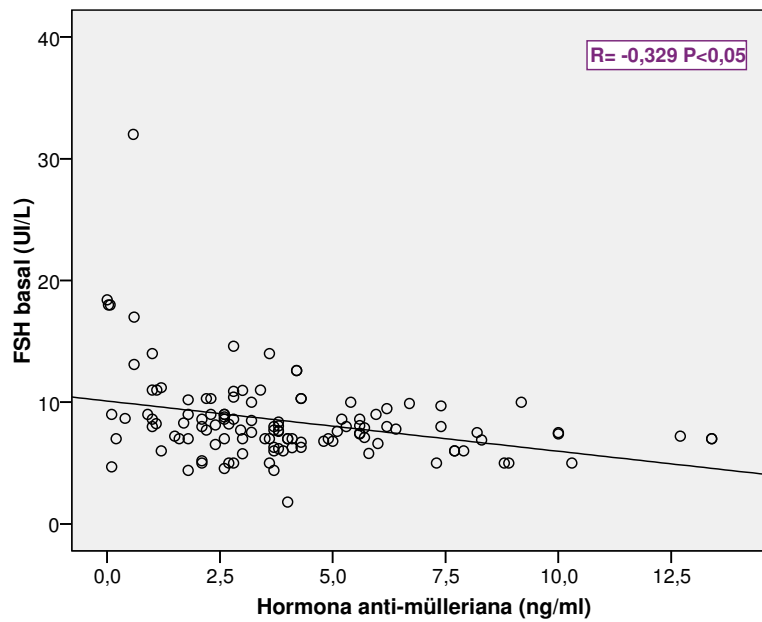


Figura 5: Correlación entre los niveles de AMH y los de FSH basal.

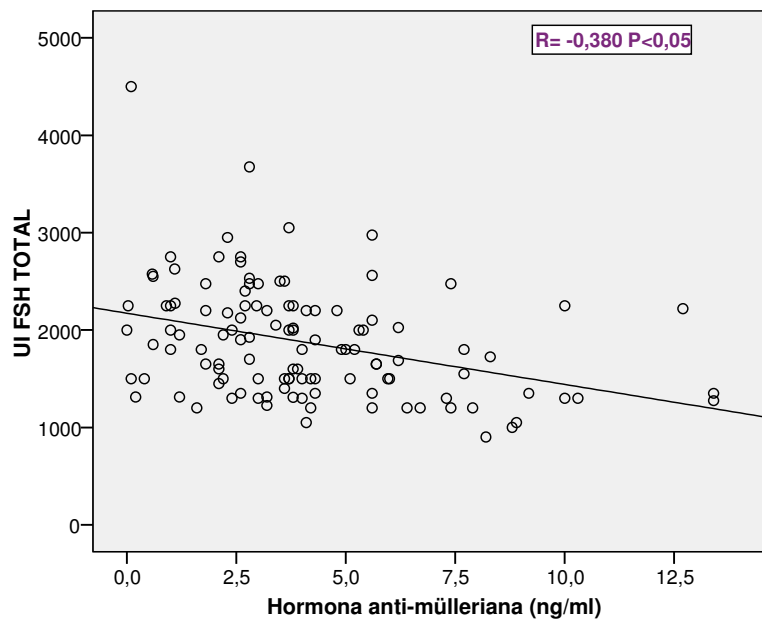
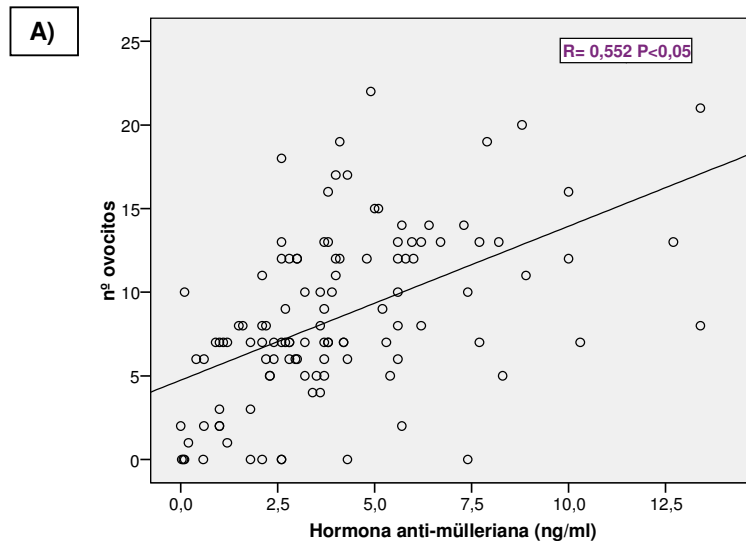


Figura 6 : Correlación entre los niveles de AMH y las unidades totales de FSH utilizada en la HOC.

Asimismo, hemos encontrado correlación positiva estadísticamente significativa entre los niveles séricos de AMH y el número de ovocitos recuperado en la punción ($r = 0,552$; $P < 0,05$), el conteaje de folículos antrales ($r = 0,599$; $P < 0,05$) y los niveles de Estradiol el día de la administración de la hCG ($r = 0,415$; $P < 0,05$). Hemos podido comprobar que la correlación de la AMH con el número de ovocitos recuperado fue similar a la existente entre el conteaje de folículos antrales y el número de ovocitos recuperado ($r = 0,640$; $P < 0,05$) (Figura 7).



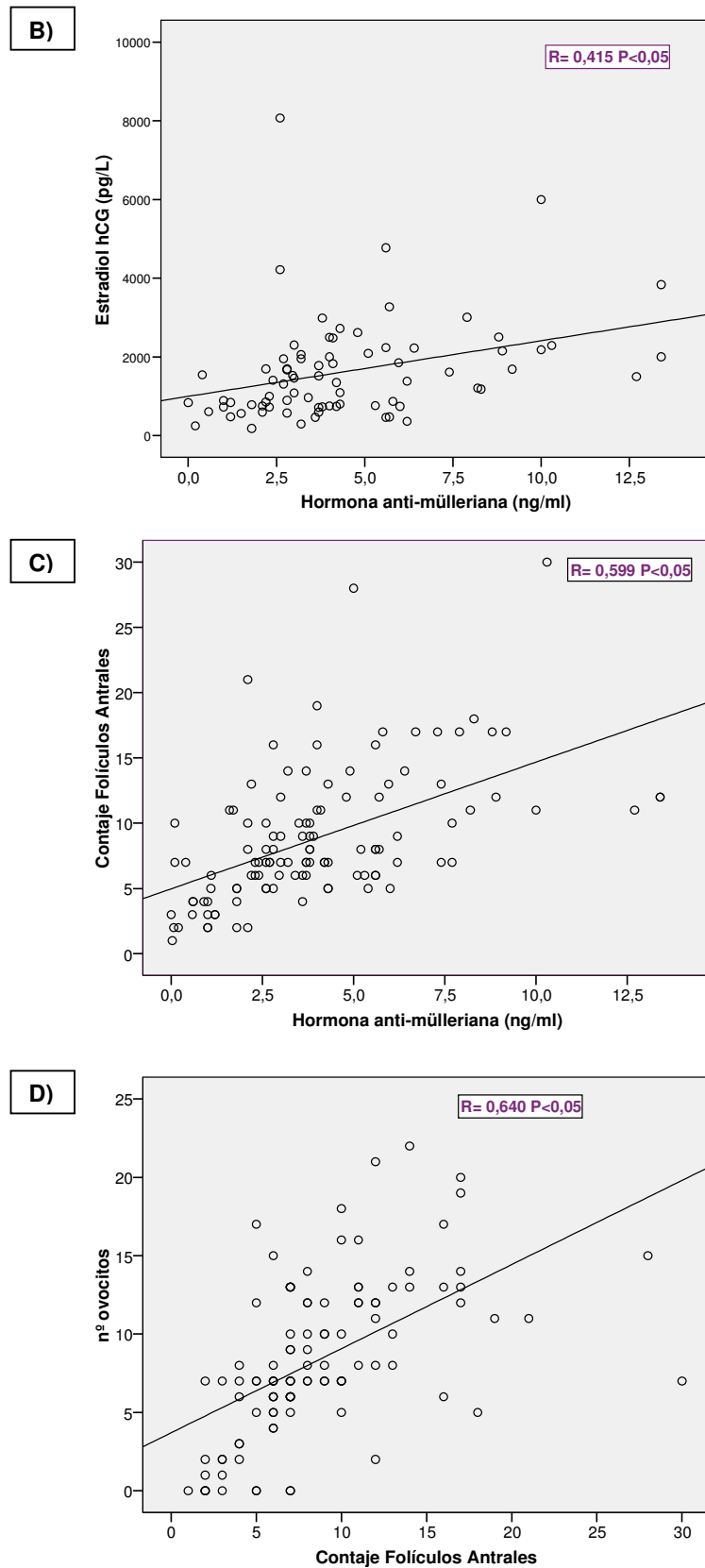


Figura 7: Correlación de la AMH con el número de ovocitos recuperado (A), el pico máximo de Estradiol (B), y el conteo de folículos antrales (C). Correlación del CFA con el número de ovocitos recuperado (D). El valor de la P nos muestra la significación de la misma.

En el análisis de la correlación de los otros marcadores bioquímicos de reserva ovárica con el número de ovocitos recuperado, hemos encontrado que es estadísticamente significativa aunque débil para la FSH basal ($r = -0,329$; $P < 0,05$) y que no es significativa para el Estradiol basal ($r = -0,084$; $P = 0,28$). Por tanto, la correlación con la variable resultado principal es más fuerte para la AMH, comparado con el resto de marcadores bioquímicos, y comparable a la del CFA.

En cuanto a la edad, la correlación de ésta con el número de ovocitos recuperado ($r = -0,035$; $P = 0,723$), con la AMH ($R = -0,036$; $P = 0,707$) y con el CFA ($r = -0,034$; $P = 0,739$) fue muy débil y no significativa.

El grupo de estudio fue dividido en 2 subgrupos en función del número de ovocitos recuperado en la punción folicular. Las pacientes con más de 3 ovocitos recuperados se encuadraron en el grupo de respuesta normal, y aquellas con 3 o menos en el grupo de baja respuesta. 95 pacientes se incluyeron en el grupo de respuesta normal y 19 en el de baja respuesta en función de este criterio. Se realizaron comparaciones entre los dos grupos para todos los parámetros (**Tabla 2**).

No se encontraron diferencias en cuanto a la edad ($33,1 \pm 3,4$ vs. $34,5 \pm 2,8$ años) ni la causa de esterilidad entre ambos grupos.

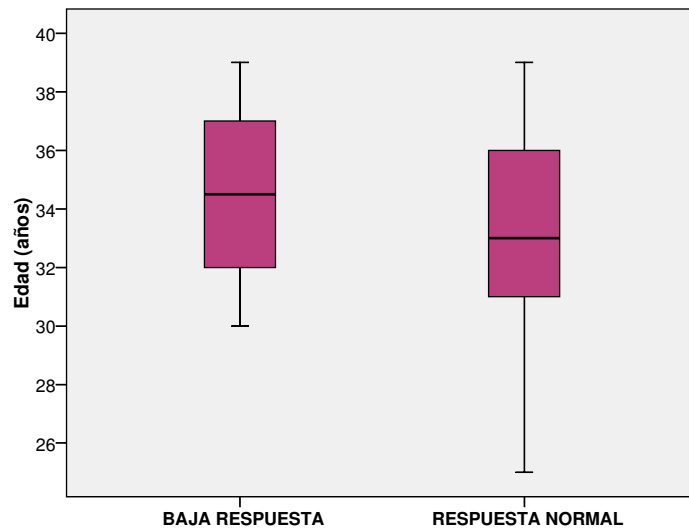


Figura 8: Comparación de la edad en el grupo de respuesta normal con en el de baja respuesta. Comprobamos que no existen diferencias estadísticamente significativas.

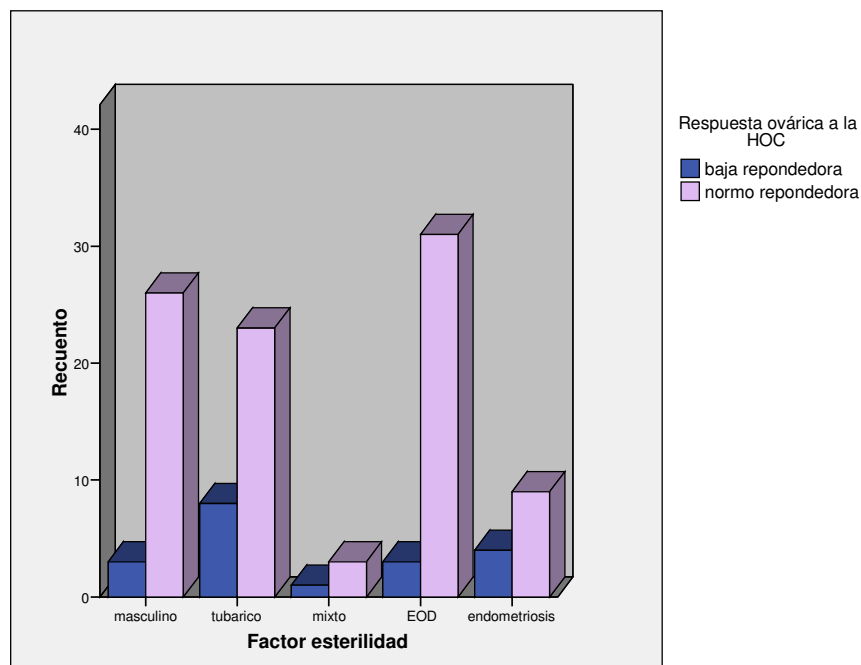


Figura 9: Frecuencias de las diferentes causas de esterilidad en el grupo de baja respuesta y en el de respuesta normal.

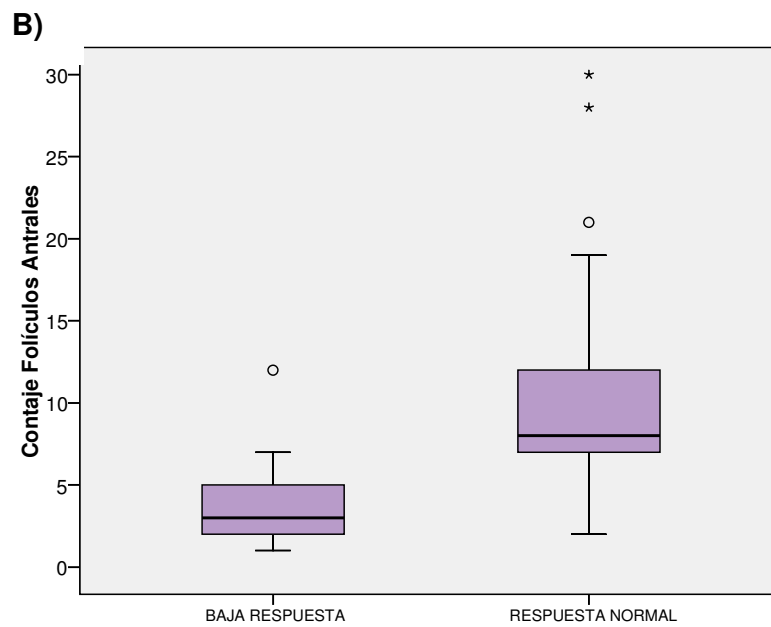
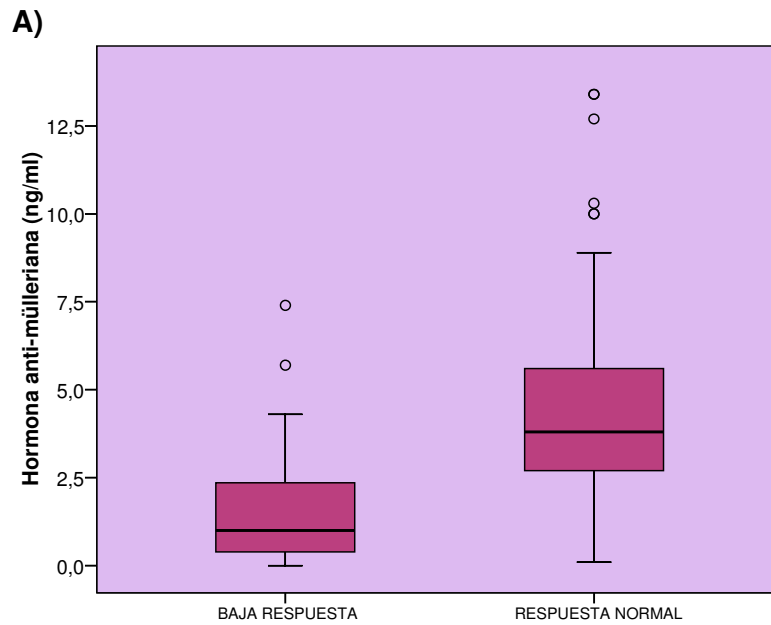
Los niveles medios de AMH fueron de $4,48 \pm 2,71$ ng/ml en el grupo de respuesta normal y de $1,79 \pm 2,03$ ng/ml para el grupo de baja respuesta, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,05$) (Figura 10).

También hemos encontrado diferencias en cuanto a los niveles séricos de FSH basal ($7,80 \pm 2,23$ vs. $11,41 \pm 6,55$ UI/L) y el conteaje de folículos antrales realizado en fase folicular temprana ($9,77 \pm 4,95$ vs. $3,94 \pm 2,62$) (Figura 10). El pico máximo de estradiol, determinado el día de la administración de la hCG fue significativamente menor en el grupo de baja respuesta ($618,0 \pm 249,32$ vs. $1808,38 \pm 1343,39$ pg/L).

Tabla 3 : Características de los test de reserva ovárica y de las pacientes en el grupo total de pacientes de FIV/ ICSI, y en bajas y normorrespondedoras separadamente

VARIABLES	TOTAL (n=114)	RESP. NORMAL (n=95)	BAJA RESPUESTA (n=19)	P
Edad (años)	33,3 (3;32)	33,1 (3;4)	34,5 (2;8)	NS
Causa esterilidad				
-Masculina (%)	29 (4;25)	26 (8;22)	3 (2;63)	NS
-Tubárica (%)	31 (19;27)	23 (17;20)	8 (1;7)	
-EOD (%)	34 (29;82)	31 (19;27)	3 (2;63)	
-Mixta (%)	4 (3;50)	3 (2;63)	1 (0;87)	
-Endometriosis (%)	13 (11;40)	9 (7;95)	4 (3;50)	
AMH (ng/ml)	3,99 (2;77)	4,48 (2;71)	1,79 (2;3)	$P < 0,05$
FSH basal (UI/L)	8,45 (3;53)	7,80 (2;23)	11,41 (6;55)	$P < 0,05$
E2 basal (pg/L)	59,2 (32;44)	56,78 (26;81)	68,79 (33;52)	NS
CFA	8,86 (5;8)	9,77 (4;107)	3,94 (2;62)	$P < 0,05$
UI FSH	1874,25 (579,91)	1813,86 (507,6)	2048,47 (781,84)	NS
Estradiol hCG (pg/L)	1628,62 (1291,98)	1808,38 (1343,39)	618,0 (32;227)	$P < 0,05$
CFA: Contaje de Folículos Antrales; EOD: Esterilidad de origen desconocido.				
Los valores se presentan como la media (desviación típica) o como el número absoluto (porcentaje)				
En el grupo de baja respuesta se han incluido los ciclos cancelados por baja respuesta				

Los niveles de estradiol basal y la dosis total de FSH empleada en la estimulación no fueron significativamente diferentes entre ambos grupos.



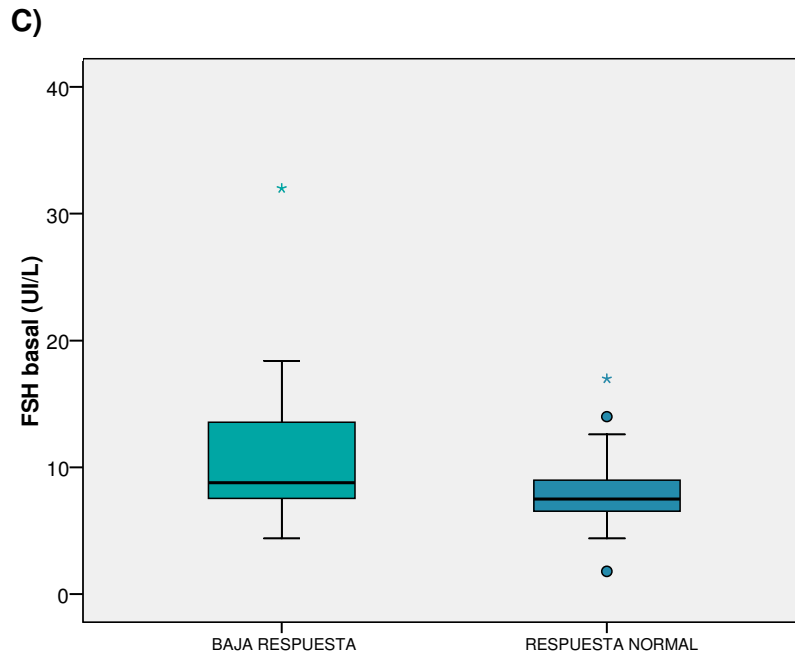


Figura 10: Niveles de AMH (A), CFA (B) y niveles de FSH basal (C) en el grupo de baja respuesta y respuesta normal.

Para la evaluación de la capacidad predictiva de respuesta ovárica de la AMH, hemos realizado el análisis de la curva ROC que presenta la hormona para baja respuesta. El área bajo la curva (AUC) es de 0,827 (0,706-0,949) ($P < 0,05$), mostrando una elevada capacidad discriminativa (Figura 11).

Para el cálculo del punto de corte de los niveles de AMH que nos permita clasificar a las pacientes en *bajas respondedoras* o *normorrespondedoras* al inicio del tratamiento, nos hemos valido de las coordenadas de la curva, seleccionando aquel valor que nos ofrece una sensibilidad y especificidad más elevadas, minimizando así la tasa de falsos positivos y falsos negativos.

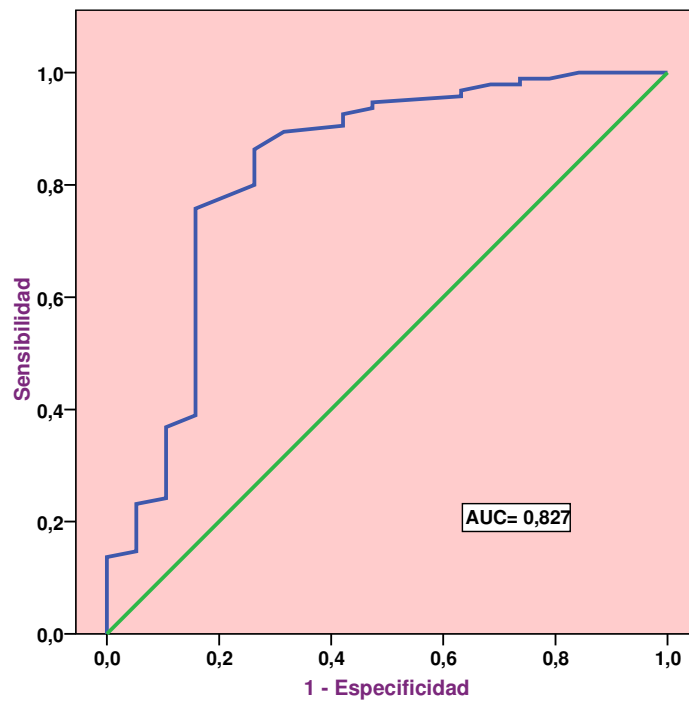


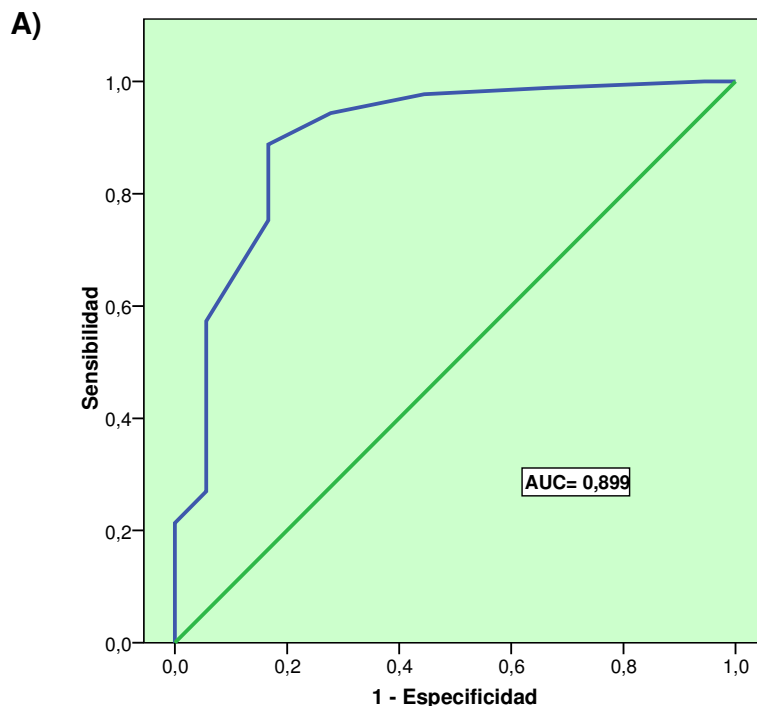
Figura 11: Curva ROC de la AMH para la predicción de baja respuesta. El AUC de 0,827 ($P < 0,05$) indica buena capacidad discriminativa.

TABLA 4 : Coordenadas de la curva en torno al punto de corte elegido, donde podemos comprobar que **2,15** es el valor que se acerca a los requisitos de 75% de *Sensibilidad* y 85% de *Especificidad*.

Positivo si es menor o igual que(a)	Sensibilidad	1 - Especificidad
,9500	,368	,042
1,0500	,526	,053
1,1500	,526	,063
1,3500	,579	,074
1,5500	,579	,084
1,7000	,579	,095
1,9500	,684	,105
2,1500	,737	,137
2,2500	,737	,158
2,3500	,737	,179
2,5000	,737	,200
2,6500	,842	,242
2,7500	,842	,263
2,8800	,842	,305

Para elegir el punto de corte idóneo, nos hemos guiado por los criterios que debe reunir un test diagnóstico en función de cuyo resultado vamos a excluir pacientes de un tratamiento de FIV. Un test diagnóstico utilizado de esta manera, debe tener un mínimo de un 75% para Sensibilidad y un 85% para especificidad, de manera que en nuestra curva, el punto que se acerca a estas condiciones es **2,15** ng/ml (73,7% de sensibilidad y 86,3% especificidad)

En un intento de comparar la capacidad discriminatoria de nuestra prueba con otras ampliamente utilizadas en la actualidad, hemos realizado la misma operación para la FSH basal y el CFA, calculando el área bajo la curva de ambas para la predicción de respuesta, siendo de 0,690 (0,542-0,838) ($P<0,05$) para la FSH y de 0,899 (0,807-0,991) ($P<0,05$) para el CFA (Figura 12).



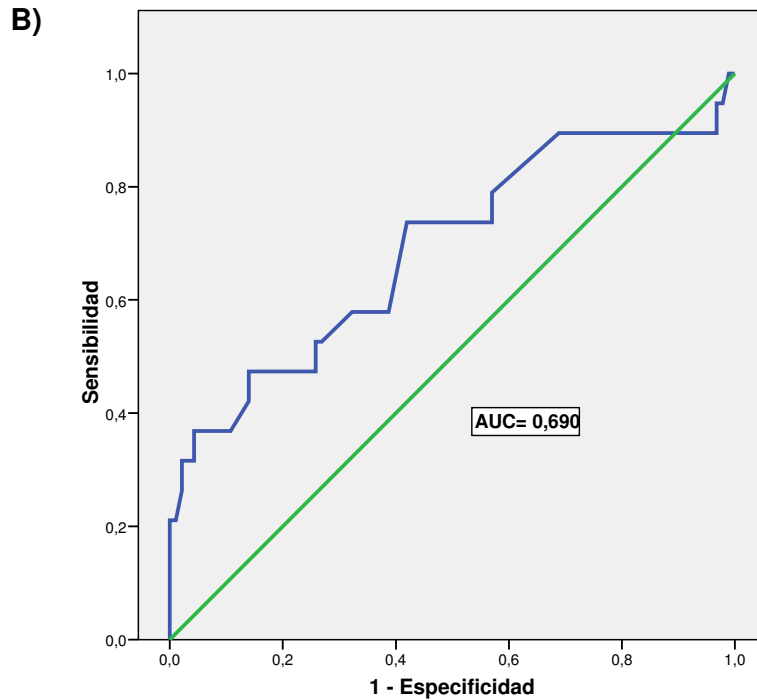


Figura 12: Curvas ROC para la predicción de baja respuesta del CFA (A) AUC= 0,899 ($P<0,05$) y de la FSH basal (B) AUC= 0,690 ($P<0,05$).

En cuanto a la predicción de gestación, hemos comprobado que la capacidad discriminadora de la AMH es prácticamente nula, ya que el área bajo la curva correspondiente es de 0,541 ($P=0,51$) (Figura 13).

Estudiando esto mismo para la FSH basal y el CFA, tenemos un área de 0,525 (0,405-0,645) ($P=0,69$) (Figura 14) para la FSH y 0,626 (0,509-0,752) ($P=0,052$) (Figura 15) para el CFA, que aunque presenta mejor capacidad discriminadora que la FSH, ésta es muy escasa.

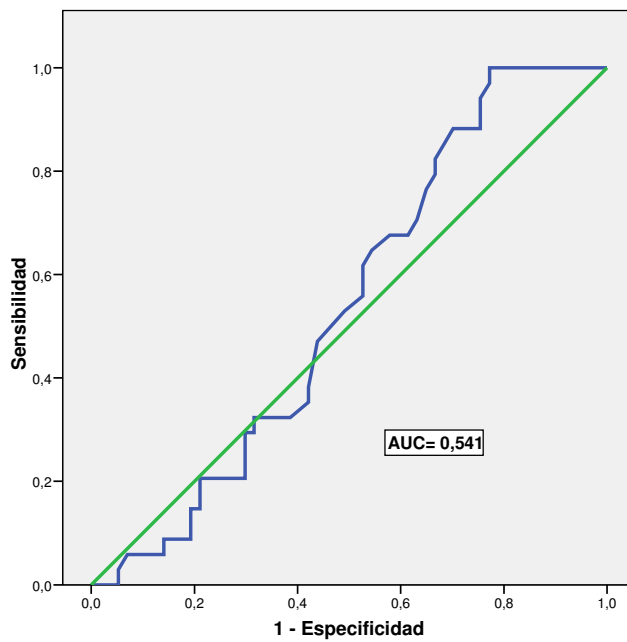


Figura 13: Curva ROC de la AMH para predicción de No gestación; AUC= 0,541 (0,423-0,658) ($P=0,51$), que indica un poder predictivo prácticamente nulo.

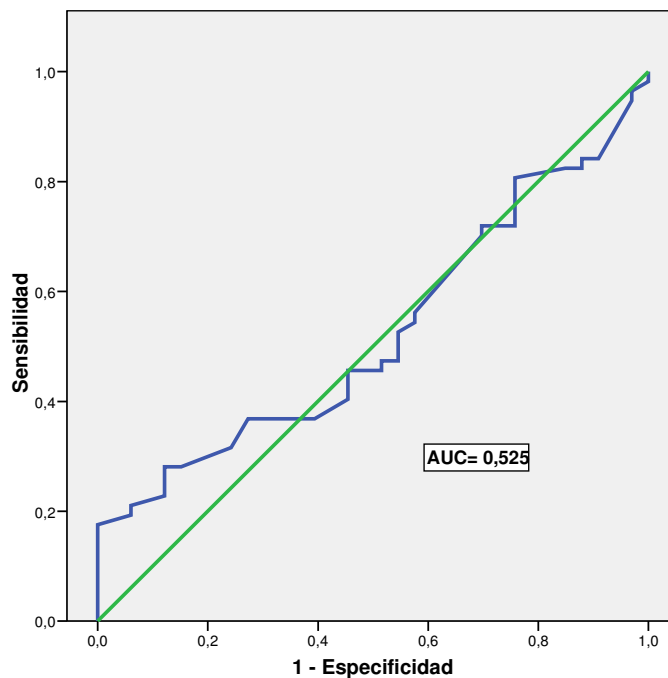


Figura 14: Curva ROC para no gestación de la FSH basal. El AUC indica nula capacidad de predicción.

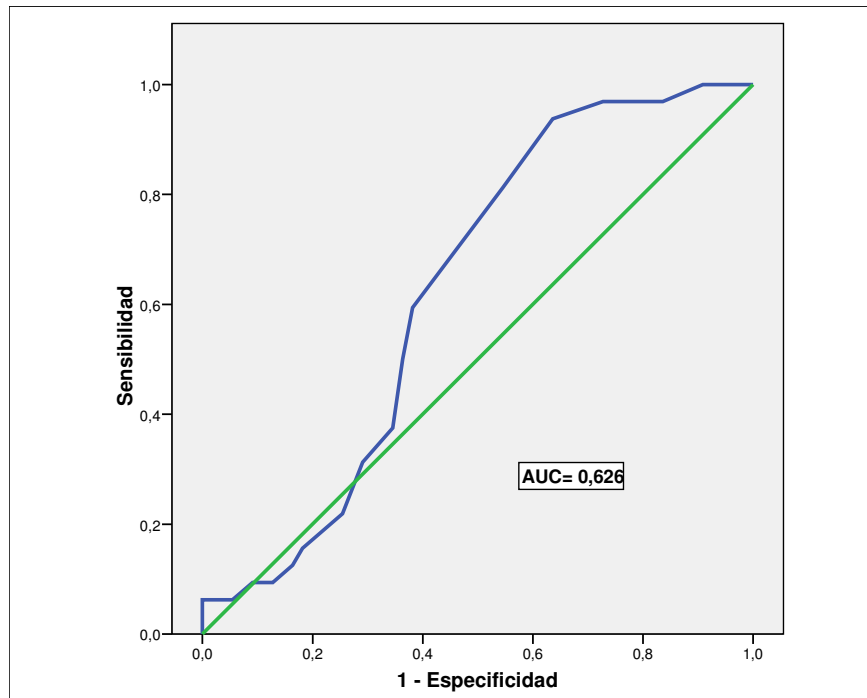


Figura 15: Curva ROC para no gestación del Contaje de Folículos Antrales. El AUC indica un poder predictivo muy pobre.

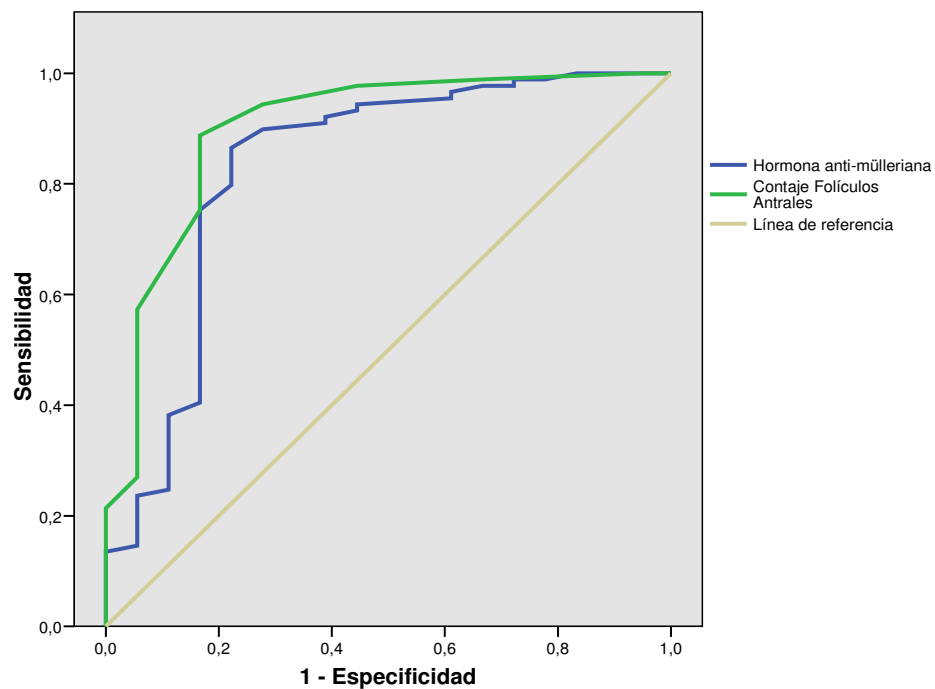


Figura 16: Curvas ROC la AMH y el CFA para predicción de baja respuesta. Podemos comprobar que son superponibles.

Con el objetivo de comprobar si la asociación de varias variables en la predicción mejora la capacidad de discriminación de baja respuesta de cada test de forma aislada (a través del área de la curva ROC de diferentes modelos multivariantes) hemos utilizando la regresión logística multivariante, calculando, asimismo, la Odds Ratio de los diferentes TRO para baja respuesta, tanto de forma aislada, como en los diferentes modelos. La interpretación de la OR para estos test sería “la probabilidad de que una paciente sea baja respondedora por cada unidad de medida que aumente el resultado del test”. Los resultados de dicho análisis se reflejan en la siguiente tabla (**Tabla 5**):

Análisis bivariante	Odds ratio (IC 95%)	P	ROC_{AUC}
CFA (por folículo)	0,48 (0,34- 0,68)	<0,05	0,899
AMH (por 1 ng/ml)	0,48 (0,33- 0,71)	<0,05	0,827
FSH (por UI/L)	1,30 (1,10- 1,54)	<0,05	0,690
Edad (por año)	1,13 (0,96- 1,34)	NS	0,603
Estradiol (por pg/L)	1,009 (0,99- 1,02)	NS	0,545
Análisis multivariante	OR (IC 95%)	P	
CFA (por folículo) y	0,55 (0,37- 0,82)	<0,05	
FSH (por UI/L) y	1,02 (0,87- 1,20)	NS	
AMH (por 1 ng/ml)	0,83 (0,52- 1,31)	NS	0,902
CFA y	0,54 (0,36- 0,79)	<0,05	
AMH	0,82 (0,52- 1,28)	NS	0,904
AMH y	0,56 (0,38- 0,83)	<0,05	
FSH	1,14 (0,96- 1,36)	NS	0,818

Tabla 5: Modelos de regresión logística para baja respuesta. Se muestra la OR ajustada con su intervalo de confianza y la significación estadística.

En esta tabla podemos observar como, aunque el AUC de la curva ROC del modelo que incluye el CFA, AMH Y FSH es de 0,902, y del modelo que incluye la AMH y el CFA es de 0,904. Diríamos, pues, que la capacidad de discriminación de los mismos es ligeramente superior a la de cualquiera de los test de forma aislada, pero, al perder significación estadística las diferentes variables incluidas en los modelos multivariantes, no sería correcto dejarlas en el modelo. Por tanto en el modelo CFA*FSH*AMH, vemos que la AMH y la FSH pierden la significación de su OR, de manera que serían excluidas del modelo, quedándonos solamente el CFA. De la misma manera, en el modelo CFA*AMH perdería significación estadística la AMH, quedando sólo el CFA, y en el último modelo, sería la FSH la que pierde la significación, quedándonos exclusivamente con la AMH.

Sin embargo, considerando la capacidad predictiva del CFA y la AMH revisando la literatura existente, podríamos dejar esta última en el modelo, que sería el siguiente: $P = 2,699 - 0,197 \times \text{AMH} - 0,613 \times \text{CFA}$ (donde P sería la probabilidad de baja respuesta). El valor obtenido estaría comprendido entre 0 y 1, de manera que los más próximos a 0 (0-0,5) serían considerados *respuesta normal* y los más próximos a 1 (0,5 a 1) *baja respuesta*, ya que es el valor que le tenemos asignado en nuestra base.

El porcentaje de acierto global (tanto de bajas respondedoras como de pacientes con respuesta normal) de cada uno de los marcadores de forma aislada y de los diferentes modelos, su sensibilidad, especificidad, VPP y VPN se encuentran reflejados en la tabla 6.

Tabla 6: Comparación entre los diferentes TRO de S, E, VPP y VPN, así como de su porcentaje global de acierto tanto en baja respuesta como respuesta normal.

S: Sensibilidad; **E:** Especificidad; **VPP:** Valor Predictivo Positivo; **VPN:** Valor Predictivo Negativo; **AG:** Acierto Global

ANÁLISIS BIVARIANTE	S	E	VPP	VPN	AG
CFA	55%	97,7%	83,3%	91,5%	90,7%
AMH	36,8%	96,8%	70%	88,4%	86,8%
FSH	21%	98,9%	80%	85,9%	85,7%
ANÁLISIS MULTIVARIANTE	S	E	VPP	VPN	AG
CFA*AMH*FSH	61,1%	95,4%	73,3%	92,3%	89,6%
CFA*AMH	66,6%	95,5%	75%	93,4%	90,7%
AMH*FSH	31,5%	97,8%	75%	87,5%	86,6%

Cuando realizamos este mismo análisis con el punto de corte calculado para la AMH de 2,15 ng/ml, la sensibilidad de nuestro test es del 72,2%, la especificidad es del 88,9%, con un VPP de 56,5% y un VPN del 94,1%, con una tasa de acierto global del 86,1%.

Una vez establecido nuestro punto de corte idóneo de la AMH para discriminar entre baja respuesta y respuesta normal, hemos comparado las medias de las mismas variables estudiadas anteriormente, en los 2 grupos que delimitaríamos según nuestro test ($AMH \leq 2,15$ ng/ml y $AMH > 2,15$ ng/ml)(Tabla 7).

La edad media fue similar en ambos grupos ($33,92 \pm 3,21$ vs. $33,23 \pm 3,36$ años) al igual que los niveles séricos de estradiol determinados en fase folicular precoz, que tampoco fueron significativamente diferentes ($61,53 \pm 42,75$ vs. $58,42 \pm 28,40$).

Las diferencias sí fueron estadísticamente significativas ($P<0,05$) para los niveles de FSH basal ($10,42\pm 5,68$ vs. $7,79\pm 2,09$ UI/L), el conteo de folículos antrales ($5,31\pm 4,1$ vs. $10,05\pm 4,81$ folículos) y el número de ovocitos recuperados en la punción ($4,26\pm 3,53$ vs. $9,76\pm 4,79$ ovocitos).

La dosis total de FSH empleada en la estimulación ($2071,96\pm 695,79$ vs. $1816,83\pm 540,80$ UI) se ha encontrado próxima a la significación estadística ($P=0,07$), aunque podemos observar que las medias son sustancialmente diferentes.

La tasa de gestación fue distinta en ambos grupos (27% en el grupo de baja respuesta y 42,6% en el de respuesta normal), pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

Tabla 7: Características de las pacientes y de los test de reserva ovárica en los grupos obtenidos al utilizar nuestro punto de corte de 2,15 ng/ml			
VARIABLE	AMH≤ 2,15ng/ml	AMH>2,15ng/ml	P
Edad(años)	33,92(3;21)	33,23(3;36)	NS
FSH basal(UI/L)	10,42(5;68)	7,79(2;9)	$P<0,05$
E ₂ basal(pg/L)	61,53(42;75)	58,42(28;40)	NS
CFA	5,31(4;17)	10,05(4;81)	$P<0,05$
FSH total (UI)	2074,96(670,10)	1813,36(539,16)	$P=0,07$
Estradiol hCG	695,85(336,43)	1815,17(1332,28)	$P<0,05$
Ovocitos recuperados	4,26(3;53)	9,76(4;79)	$P<0,05$
Tasa gestación	27%	42,6%	$P=0,06$
Los valores se expresan como la media (desviación típica) o como un porcentaje.			

6. DISCUSIÓN

En este estudio hemos investigado de forma prospectiva si los niveles séricos de AMH pueden predecir la respuesta ovárica durante el primer ciclo de tratamiento para FIV. Hemos observado una buena correlación de la AMH con la respuesta del ovario, representada por el número de ovocitos recuperados en la punción. La respuesta del ovario a niveles elevados de gonadotropinas puede considerarse una medida fiable de la cohorte de folículos antrales seleccionables. Dado que este número de folículos antrales parece estar relacionado con el tamaño del pool de folículos primordiales⁽²³⁶⁾, la respuesta del ovario puede ser considerada un reflejo de la *reserva ovárica*.

La reserva ovárica comprende dos elementos: el tamaño del stock de folículos primordiales y la calidad de los ovocitos⁽⁹⁶⁾. Desde el pool de folículos primordiales, los folículos primarios iniciarán un proceso de maduración y desarrollo pasando por folículos secundarios (preantrales) hasta el pool de folículos antrales, desde el que mensualmente un folículo ovulatorio será seleccionado.

En roedores, la AMH es secretada inmediatamente tras la transición de folículo primordial a primario, y la expresión de la misma desaparece cuando los folículos son seleccionados para la ovulación o se vuelven atrésicos⁽⁶⁸⁾. En el ovario humano, la expresión de la proteína de la AMH también se detecta en las células de la granulosa de los folículos desde el estadio primario hasta el estadio antral grande, cuando los folículos han adquirido dependencia de FSH⁽⁵⁾.

Debido a que el tamaño del pool de folículos primordiales es difícil de medir directamente, un marcador que refleje todo el número de folículos que han hecho la transición desde el pool de folículos primordiales al pool en crecimiento sería una buena medida indirecta. La Hormona anti-Mülleriana sería dicho marcador, por su implicación en la regulación del reclutamiento de folículos primordiales⁽⁸²⁾, mecanismo importante en la depleción del pool primordial⁽²³⁷⁾, y es producida en todos los estadios foliculares hasta la dependencia de FSH.

La contribución relativa de las diferentes clases de folículos al nivel final de AMH no está clara, Aunque los folículos antrales de 2-5 mm producirían más AMH como reflejo de su elevado número de células de la granulosa, los folículos de menor tamaño contribuirían significativamente en base a su elevado número. Los mayores niveles de AMH en pacientes con Síndrome del Ovario poliquístico tampoco nos aportan una respuesta a este asunto, dado que sus ovarios contienen sobre el doble de folículos preantrales (primarios y secundarios) y antrales^(238;239).

Existen indicios de que la producción o secreción de la AMH por las células de la granulosa no se encuentra bajo un control hormonal extraovárico estricto. En ratones transgénicos, todos los parámetros foliculares en animales heterocigotos para AMH (-/ +) se encuentran entre aquellos de los del tipo salvaje (+/ +) y los AMH-null (-/ -), indicando que la producción de AMH depende fundamentalmente de la actividad del gen en sí mismo, y que no es regulada por las hormonas gonadotropas⁽⁸²⁾.

Esto constituiría una ventaja frente a otros marcadores bioquímicos de reserva, por la escasa variación inter- e intraciclo, demostrada por Cook *et al.* ⁽²⁴⁰⁾.

6.1 Definición de baja respuesta

Nuestro estudio prospectivo fue realizado para evaluar la capacidad de la AMH determinada en fase folicular precoz para predecir baja respuesta definida por ≤ 3 ovocitos recuperados o por la cancelación del ciclo debido a un crecimiento folicular insuficiente (< 3 folículos en repuesta a la estimulación con gonadotropinas). Aunque en diferentes estudios se han utilizado diferentes criterios para definir baja respuesta, el más utilizado ^(120;121;138;233-235) ha sido el empleado por nosotros en nuestro análisis de datos, ya que desde el punto de vista práctico, se considera que son necesarios 4 ovocitos para conseguir una media de 2 embriones aptos para transferir ^(138;233).

6.2 Correlación entre los diferentes tests de reserva ovárica y la respuesta del ovario al tratamiento

Hemos encontrado una buena correlación entre los niveles séricos de AMH y la respuesta ovárica ($R=0,552$; $P<0,05$), representada por el número de ovocitos obtenidos durante el primer tratamiento de FIV/ICSI, así como entre la hormona y el conteo de folículos antrales (CFA) ($R=0,599$; $P<0,05$), marcador plenamente validado para estimar la reserva del

ovario^(113;138;187;193;241). La correlación entre el CFA y el número de ovocitos recuperado fue muy aceptable y significativa ($R=0,640$; $P<0,05$). Además, estas correlaciones han sido más fuertes que las de la FSH ($R=-0,329$; $P<0,05$) o el estradiol ($R=-0,084$; NS) basal con el número de ovocitos, o con el CFA ($R=-0,114$; NS para el estradiol y $R=-0,467$; $P<0,05$), lo que ya ha sido demostrado por Fanchin et al.⁽²²⁰⁾ y Dehghani-Firouzabadi et al.⁽²⁴²⁾ previamente.

Las razones que explican esta mayor intensidad de correlación de la AMH con el CFA y el número de ovocitos que otros marcadores de reserva ovárica, no están claras, pero podrían estar relacionadas con la diferente regulación de la AMH con respecto a la de la FSH o el estradiol. Durante la transición lúteo-folicular, la secreción de E_2 ⁽²⁴³⁾ por los folículos antrales precoces modula su propia estimulación por la FSH. Esto implica que los niveles de estradiol no dependen exclusivamente del grueso de células de la granulosa activas, representadas por el número y tamaño de folículos, sino también del estímulo de la FSH. Aunque se conoce poco acerca de los efectos de la FSH en la expresión de la AMH durante la fase folicular precoz, puede presumirse que esta hormona es menos sensible a FSH que el estradiol.

6.3 Correlaciones entre los diferentes tests de reserva ovárica

No obstante, hemos observado una relación negativa significativa ($R=-0,326$; $P<0,05$) entre la AMH y la FSH. Mientras que este dato se contrapone

a la hipótesis del papel estimulante de la FSH sobre la producción de la AMH por las células de la granulosa, no excluyen su potencial acción inhibidora sobre la producción de AMH demostrada en ratas por Baarends *et al.*⁽⁶⁸⁾

Sin embargo, dado que en nuestra serie existe una correlación tanto de la AMH como de la FSH con un tercer parámetro común (CFA), su correlación mutua podría ser meramente indirecta y no causal.

No hemos hallado relación entre la AMH y el estradiol basal en este estudio. Esto contrasta con los hallazgos de Cook *et al.* en 2002 que encontraron correlación negativa entre estas dos hormonas⁽²³⁸⁾, sugiriendo que la producción de estradiol era suprimida por la AMH. En estudios animales se ha demostrado que la AMH suprime la transcripción del gen CYP19⁽²⁴⁴⁾. Esta correlación no se ha encontrado en otros estudios, lo que podría significar únicamente, diferencias en los tiempos de recogida de muestras, ya que parece que cuando la recogida es en fase folicular precoz, no se encuentra esa correlación⁽²⁴⁴⁾.

6.4 Correlación entre la AMH y marcadores indirectos de la respuesta del ovario a la hiperestimulación ovárica controlada (pico máximo de estradiol y dosis total de FSH utilizada)

Apoyando la idea de la asociación entre la AMH y la respuesta del ovario, hemos obtenido una correlación positiva significativa entre la AMH basal y el pico máximo de estradiol ($R=0,415$; $P<0,05$), siendo

significativamente menores en el grupo de baja respuesta ($618,0 \pm 249,32$ vs. $1808,38 \pm 1343,39$), manteniéndose esta diferencia al clasificar a las pacientes en función de nuestro punto de corte. Estos resultados apoyan la relación entre una peor respuesta y menores niveles de AMH basal, y también ha sido corroborado por La Marca *et al* en 2004⁽²⁴⁵⁾ y Nakhuda *et al.* en 2006⁽²⁴⁶⁾.

Otro dato interesante ha sido el hallar una correlación negativa significativa ($R=-0,380$; $P<0,05$) entre los niveles de AMH y la dosis total de FSH empleada en la estimulación, lo que expresa la necesidad de mayor dosis de FSH en pacientes con niveles menores de AMH, y presumiblemente con peor reserva ovárica. Sin embargo, la fuerza de la asociación no es muy buena, lo que puede deberse a que en pacientes con AMH menor, ante una respuesta deficitaria con las dosis iniciales de gonadotropinas, se proceda a un ajuste de dosis en el primer control ecográfico, para intentar mejorar la respuesta.

Esta también podría ser la explicación de que no encontremos diferencias estadísticamente significativas, aunque el valor de la P se encuentra cercano al límite, en la dosis total de FSH empleada entre los dos grupos de pacientes aunque podemos observar que es mayor en el grupo de baja respuesta. No se puede descartar que, si el tamaño del subgrupo de baja respuesta fuese mayor, la diferencia alcanzase la significación estadística.

6.5 El papel de la edad en la predicción de respuesta

Sin embargo, no hemos encontrado correlación entre la edad de las pacientes y el número de ovocitos, el CFA ($R=-0,034$; NS), la AMH ($R=-0,036$; NS), el estradiol ($R=0,158$; NS) o la FSH basal ($R=0,164$; NS). Al establecer las comparaciones entre grupos, las medias de edad de ambos fueron muy similares, sin encontrarse diferencias significativas. Esto indica que la edad se comportaría como un factor independiente en cuanto a la respuesta a la estimulación, y, por tanto, en cuanto a la reserva ovárica. Este hecho podría ser explicado por la gran variabilidad individual en cuanto al estado del pool de folículos en una determinada edad⁽⁹⁶⁾.

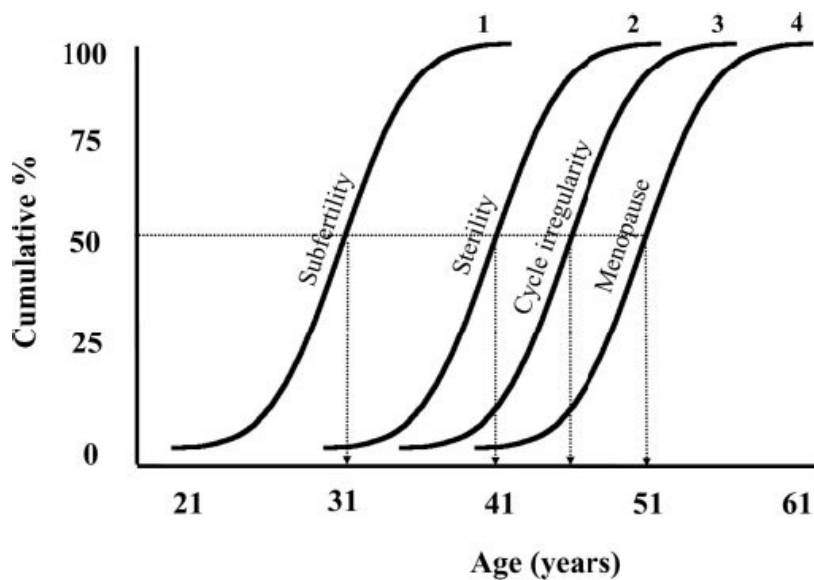


Figura 16 : Variaciones en la edad en la que se producen diferentes etapas del envejecimiento ovárico (tomado de te Velde y Pearson, 2002 ®).

6.6 Elección del punto de corte de AMH sérica

Nuestro trabajo respalda la capacidad predictiva de respuesta ovárica de la AMH, al haber obtenido un valor elevado en el área bajo la curva ROC (0,827). Además hemos podido comprobar que la capacidad de discriminación entre baja respuesta y respuesta normal es similar a la del CFA (0,899) y claramente superior a la que nos ofrece la FSH basal (0,690). Un meta-análisis muy reciente realizado por Broer et al.⁽²⁴⁷⁾, apoya estos resultados, ya que encontraron valores muy similares analizando los estudios recientes publicados que exponen estos datos. Otro trabajo publicado en 2008 por Riggs et al.⁽²⁴⁸⁾, arroja unos resultados similares a los de este trabajo, en cuanto a la capacidad predictiva de respuesta, ya que encuentran que el AUC para la AMH en cuanto a baja respuesta es de 0,810.

Se considera que un test de reserva ovárica debe tener al menos un 75% de sensibilidad y un 85% de especificidad, que minimice la exclusión de pacientes de un programa de FIV, por una predicción de baja respuesta. El punto de corte que nos ofrece mejor capacidad de discriminación, con los niveles deseados de sensibilidad y de especificidad, ha sido 2,15 ng/ml, lo que es difícil de contrastar con otros estudios debido a que no existe un kit estándar internacional para la determinación de AMH, de manera que las comparaciones entre diferentes laboratorios resultan complicadas⁽²²⁶⁾.

Además, la información acerca de los puntos de corte para discriminar entre pacientes con buen pronóstico y mal pronóstico es escasa en la literatura. De hecho, Silberstein *et al.*⁽²²⁹⁾ utilizan la mediana de todos los valores de AMH (en el momento de la administración de hCG 2,7 ng/ml) para distinguir entre 2 grupos a estudio en términos de implantación ($P < 0,001$). Eldar-Geva *et al.*⁽²²⁵⁾ publicaron un punto de corte de 18 Pmol/L (~ 2,52 ng/ml) que permitió una predicción significativa de gestación evolutiva ($P < 0,01$). Un punto de corte de 4,9 pmol/L (~ 0,69 ng/ml) discriminó entre ciclos evolutivos y ciclos cancelados en el trabajo de Peñarrubia *et al.*⁽²²⁶⁾ y utilizando un umbral de 8,1 pmol/L (1,13 ng/ml), la utilización de los niveles de AMH podría predecir una reserva ovárica pobre en un ciclo de FIV, con una sensibilidad del 80% y una especificidad del 85%, según Tremellen *et al.*⁽²⁴⁹⁾

Muttukrishna *et al.*^(217;221), definieron un punto de corte de 0,2 ng/ml de AMH, como mejor marcador aislado para predecir baja respuesta.

6.7 Predicción de gestación de los tests.

En cuanto a la predicción de gestación, ninguno de los tres marcadores se ha mostrado válido a la hora de predecir gestación, que se considera, desde el punto de vista práctico el único punto final importante de un test de reserva ovárica^(118;125;138;218;250).

Esto concuerda con trabajos previos y otros recientes que han constatado que las determinaciones hormonales podrían ser útiles para evaluar la respuesta ovárica a la estimulación, pero no tanto en su predicción del resultado reproductivo^(118;119;123;139;142;152;153). Esto se debe a la falta de capacidad de predicción del aspecto cualitativo de la reserva ovárica, limitándose, fundamentalmente al aspecto cuantitativo.

Pocos trabajos han podido demostrar una clara relación entre el nivel actual de AMH y la calidad ovocitaria⁽²²⁸⁾. Ebner *et al.* encontraron que aproximadamente la mitad de los ovocitos que se obtienen de pacientes con niveles normales de AMH no se hallaban afectados, comparado con sólo 1/3 en los grupos con niveles bajos y elevados.

Debido a que la AMH se produce en las células de la granulosa en estadios foliculares precoces, niveles bajos podrían asociarse con un fallo en la expresión en estas células, que podría dañar irreversiblemente el gameto. Curiosamente, ni la tasa de fecundación ni la calidad embrionaria pudieron estimarse utilizando los niveles basales de AMH. Esto contrasta con el trabajo de Silberstein *et al.*⁽²²⁹⁾, que encontraron embriones de mejor morfología y comportamiento de clivaje en pacientes con niveles de AMH \geq 2,7 ng/ml, comparado con las pacientes por debajo de dicho umbral. Un trabajo reciente por Nelson *et al.*⁽²⁵¹⁾, ha demostrado que la AMH sería un predictor superior al resto en cuanto al éxito en FIV (recién nacido vivo), lo que no ha podido ser apoyado por nuestros hallazgos.

Estudios recientes apuntan al papel que podría tener la determinación de la AMH en líquido folicular a la hora de estimar la competencia del folículo y el ovocito^(248;252), siendo un marcador posible de los aspectos cualitativos de la reserva del ovario.

6.8 Predicción de baja respuesta a la hiperestimulación ovárica controlada de la AMH

La eficacia en la predicción de baja respuesta a la estimulación ha sido claramente mejor que para la ocurrencia de gestación. Como hemos visto, esto puede ser explicado por los siguientes factores:

- 1) Que la probabilidad de gestación tras FIV depende de muchos más factores que la reserva ovárica sola.
- 2) Que la existencia de gestación tras un test de reserva ovárica fue evaluada tras un único ciclo de FIV, y por ello podría no representar de forma fiable la capacidad reproductiva de la mujer.
- 3) Que la respuesta a la estimulación parece representar el tamaño de la cohorte de folículos sensibles a FSH presentes de forma continua en los ovarios, y se relaciona directamente con la magnitud de la reserva ovárica (El pool de folículos primordiales restantes)⁽²³⁶⁾.

La respuesta ovárica pobre se ha asociado con una probabilidad de embarazo reducida en el tratamiento actual, así como en ciclos posteriores, y, como tal sería buena indicadora del estado de la reserva del ovario, fundamentalmente desde el punto de vista cuantitativo, pero también en algunos aspectos del cualitativo^(233;253;254). La predicción adecuada de baja respuesta podría, por tanto, tener valor clínico si las perspectivas de gestación son tan desfavorables que una paciente con predicción de baja respuesta sería denegada para tratamiento.

6.9 Los modelos multivariantes

En cuanto a los modelos multivariantes, la revisión sistemática por Broekmans et al.⁽¹¹³⁾, puso de manifiesto que ninguno de los modelos planteados en los diferentes estudios fue superior al resto, y que sólo uno de los modelos estudiado por Bancsi et al.⁽¹³⁸⁾ cumplía los requisitos de unos niveles adecuados de sensibilidad y especificidad, lo que no los hacía superiores a los tests de reserva ovárica utilizados de forma aislada.

Nosotros hemos estudiado tres posibles modelos que combinaron los tres marcadores que hemos incluido en nuestro análisis, de diferentes formas. Como explicamos en el apartado de resultados, aunque los coeficientes de regresión de cada uno de los tests de forma aislada tenían significación estadística, ésta se perdía al asociarlos en distintos modelos, lo que hacía estadísticamente incorrecto el generar dichos modelos. De forma meramente académica decidimos igualmente estudiar su eficacia predictiva

a través del cálculo de sus sensibilidades, especificidades, VPP y VPN y hemos podido comprobar que no mejoraban de forma sustancial la predicción que nos puede ofrecer el empleo de la AMH o el CFA de forma aislada. Por tanto, nuestros datos respaldan lo expuesto por Bancsi *et al.* en 2002 y por Kwee *et al.* en 2007⁽²⁵⁵⁾ que mostraron que los diferentes modelos multivariantes no mejoraban la predicción de baja respuesta. Además, en el estudio de Kwee *et al.* les pasó algo similar a nosotros, que al realizar el análisis multivariante, las diferentes variables perdían significación estadística, quedando excluidas, y derivando de este modo, en modelos de una sola variable o 2 en un caso.

6.10 Valor clínico de los Tests de Reserva Ovárica

Un aspecto de valor clínico requiere especial mención. Los TRO son utilizados fundamentalmente como pruebas *diagnósticas*, indicando que en caso de prueba alterada, se realiza el diagnóstico de reserva ovárica disminuida^(110;117). Por el hecho de que por la evaluación realizada por el test, se utilizan las variables de verdadera reserva ovárica (baja respuesta ovárica y no gestación), y que el resultado falso positivo eliminaría parejas parejas de un intento de FIV, parece claro que los TRO deberían ser considerados como pruebas de cribado.

Esto implicaría que un resultado alterado del test, necesitaría la confirmación a través de otro test. Este otro test sería, por ejemplo, un primer intento de FIV, donde la respuesta ovárica es el test adicional. De

forma alternativa, las diferentes combinaciones de los tests predictivos independientes, o la repetición del test inicial podría mejorar el funcionamiento del test de forma aislada^(138;195;210;218;241).

Deberíamos recordar que el objetivo de cualquier TRO es la identificación de mujeres con reserva ovárica pobre para su edad. Esto implicaría que la edad cronológica es siempre el primer paso en el manejo de la reserva ovárica. En mujeres jóvenes, el TRO ayudaría a clasificar bajas respondedoras y al manejo directo en estos casos, estimando el tamaño de la cohorte sensible a FSH. En mujeres mayores, los TRO ayudarían a identificar aquellos casos que, a pesar de su edad, aún tendrían posibilidades aceptables de conseguir embarazo mediante FIV, dado que la capacidad de respuesta a la estimulación se pronostica como normal o incluso elevada⁽²⁵⁴⁾.

Nuestros datos apoyan esta hipótesis, ya que la edad ha sido similar en el grupo de baja respuesta y en el de respuesta normal, no correlacionándose con la respuesta del ovario.

En cuanto al valor clínico de la AMH, consideramos que utilizándola con el punto de corte que hemos establecido de forma razonada, mejoraríamos en la predicción de repuesta, disminuyendo sustancialmente la tasa de falsos negativos, ya que utilizando la FSH con 10 como punto de corte, la sensibilidad es del 42%, y con nuestro punto de corte de AMH, ésta tiene una sensibilidad del 73,7%. Con esto podríamos detectar un mayor

número de verdaderas bajas respondedoras, logrando así planificar el tratamiento más adecuado para intentar optimizar los resultados. Si bien no se ha demostrado que alguna de las estrategias de tratamiento sea mejor que las otras⁽²⁷¹⁾, en casos de pacientes con predicción de baja respuesta y perfil desfavorable (edad mayor de 38 años, baja respuesta de forma reiterada y TRO alterados), sería recomendable desaconsejar el tratamiento por las bajas probabilidades de éxito.

La especificidad es similar con ambos tests. El VPP y el VPN mejorarían sustancialmente con la aplicación de la AMH (38 vs. 51,8% y 87,9 vs. 94% respectivamente). Debido a que no existe un punto de corte universalmente establecido para el CFA, no podemos realizar comparaciones, pero utilizando las coordenadas de nuestra curva ROC del CFA para baja respuesta, podemos ver que para el punto de corte de 5,5 folículos antrales, la sensibilidad es del 83% con una especificidad superior al 95%.

Por tanto, el CFA sería el mejor marcador de respuesta ovárica, seguido por la AMH, y ambos constituirían un fiel reflejo del pool de folículos primordiales restantes.

6.11 Ventajas de la AMH frente al CFA

Sin embargo, el uso de la AMH presentaría una serie de ventajas sobre el del CFA:

-Escasa variabilidad intra e interciclo⁽²⁴⁰⁾, lo que sería beneficioso al poder determinarse en cualquier momento del ciclo, sin la necesidad de realizarse en fase folicular precoz.

-Gran variabilidad del CFA en la práctica clínica diaria, debido a la gran variabilidad interobservador, debida al tiempo de duración de la exploración, la experiencia del médico y, de forma notable, la reserva ovárica esperada en función de la edad de la paciente.

-Aunque actualmente la disponibilidad del kit para la determinación de la AMH puede constituir un problema, seguramente en poco tiempo el sistema de medición sea integrado en los grandes sistemas automatizados, con los chequeos de validación inherentes y una limitada variabilidad del ensayo.

-La AMH presenta una mayor reproducibilidad interciclo que la de la FSH, inhibina B y CFA, demostrada por Fanchin *et al.* en 2005⁽²⁵⁶⁾.

Estudios recientes han demostrado que una baja respuesta a gonadotropinas se asocia con una menopausia precoz^(257;258). La AMH también parece ser una candidata prometedora para la transición menopáusica⁽²⁵⁹⁾. Nuestros resultados muestran que niveles $\leq 2,15$ ng/ml son altamente indicativos de reserva ovárica disminuida, apoyando el valor de la AMH como test precoz de advertencia de función ovárica agotada cuando los niveles de FSH se encuentran en rango normal⁽²⁶⁰⁾.

6.12 Costes de los diferentes tests

En cuanto a los costes, según la información proporcionada por el Servicio de Bioquímica, 96 determinaciones de Hormona anti-Mülleriana suponen un coste de 652,543 euros, frente a un coste de 184,23 euros para 100 determinaciones de FSH. Estas diferencias habría que relativizarlas a la eficacia de cada uno de los marcadores, que como hemos visto es significativamente superior para la AMH (mayor eficiencia). Esto podría suponer lograr mejores resultados individualizando el tratamiento de forma adecuada, optimizando así cada ciclo y pudiendo evitar la repetición de un ciclo que ha fracasado, con el consiguiente ahorro global del tratamiento.

Además, habría que considerar que la extensión del uso de la hormona lograría abaratar los costes de su determinación, convirtiéndola en un marcador aún más eficiente.

Los retos futuros acerca de la AMH, conllevan la disponibilidad de un sistema de determinación estandarizado, así como el desarrollo de agonistas y antagonistas de la hormona como posibles herramientas que permitan lograr contracepción y mayor longevidad del ovario.

7. CONCLUSIONES

1. La Hormona anti-Mülleriana es un buen marcador del aspecto cuantitativo de la reserva ovárica, al ser altamente predictiva de la respuesta del ovario a la hiperestimulación ovárica controlada, con elevadas sensibilidad y especificidad.
2. La hormona determinada en sangre no es apta en cuanto a la predicción de gestación como tal, de manera que constituye una deficiente medida del aspecto cualitativo de la reserva del ovario.
3. La AMH se correlaciona mejor que la FSH, el estradiol y la Edad, con el número de ovocitos recuperados en la punción folicular.
4. El poder de predicción de respuesta de la AMH es superior al de la FSH, marcador muy utilizado en la actualidad, y comparable al del conteo de folículos antrales, ampliamente validado como estimador del pool de folículos primordiales.
5. La capacidad predictiva ha resultado similar a la del conteo de folículos antrales, con lo que podríamos beneficiarnos de las ventajas que nos ofrece la AMH, sin disminuir de forma sustancial la eficacia en la predicción.

6. Dado que la eficacia predictiva de la AMH es superponible a la del CFA, y nos ofrece una serie de ventajas frente a éste, sería beneficioso en la práctica clínica el utilizar como primer paso de cribado la determinación de AMH. Al sufrir escasa variación intra- e interciclo podría determinarse en cualquier momento del ciclo, sin necesidad de un examen ecográfico extra, y evitando la variabilidad interobservador asociada al CFA.
7. Los modelos multivariantes no han resultado ser superiores a las variables de forma aislada, siendo el mejor predictor el conteo de folículos antrales, seguido muy de cerca por la AMH y a cierta distancia la FSH, todos ellos determinados en fase folicular precoz.
8. La determinación de la Hormona anti-Mülleriana supone un mayor coste absoluto, frente a la utilización de la FSH, aunque valorando su mayor capacidad predictiva, una mejor planificación del ciclo permitiría un considerable ahorro global.

APÉNDICE

HORMONA ANTI-MÜLLERIANA COMO MARCADOR DE RESERVA
OVÁRICA

HOJA INFORMATIVA SOBRE EL ESTUDIO

PROMOTORA DEL ESTUDIO: Dra. M Carmen Cuadrado Mangas

INVESTIGADORA PRINCIPAL: Dra. Iria Aparicio Rodríguez

Usted va a formar parte de un estudio clínico con el que se pretende mejorar la efectividad de la técnica de Fecundación In Vitro y mejorar las tasas de éxito de la misma.

El estudio consiste en la determinación de la **Hormona anti-Mülleriana** en su muestra de sangre obtenida por punción venosa, junto con la FSH y estradiol que se suelen cuantificar de rutina previamente a cualquier técnica de reproducción asistida.

La duración prevista de este ensayo es de 3 años y se realizará sobre alrededor de 120 pacientes de nuestra consulta que cumplan una serie de requisitos: 1) Primer ciclo de FIV; 2) Ciclos menstruales regulares; 3) Presencia de ambos ovarios; 4) No evidencia de alteraciones endocrinas.

Las visitas a la consulta de Esterilidad no variarán a pesar de su inclusión en este estudio y no precisará ningún procedimiento extraordinario a los habitualmente empleados en la realización de cualquier FIV. No precisará la toma de ningún fármaco experimental y no presentará efectos adversos o complicaciones diferentes a los de cualquier ciclo de FIV rutinario.

Con este estudio se espera poder emplear esta hormona como marcador indirecto de la reserva de folículos que existen en el ovario, para poder planificar así una estrategia de tratamiento adecuada a cada paciente, mejorando con ello las tasas de éxito de la técnica.

La inclusión en este estudio es voluntaria y la no participación en el mismo no comportará ningún perjuicio ni para su salud ni para el éxito del tratamiento de fecundación. Usted podrá abandonar el estudio en cualquier momento sin que ese hecho disminuya la calidad asistencial hacia su persona. Los investigadores encargados se comprometen a dar información sobre datos relevantes derivados del estudio que puedan influir en su decisión de continuar participando en el mismo.

Los datos extraídos serán tratados de forma confidencial según lo establecido en la ley LOPD 15/1999. Estos datos, así como los resultados derivados del estudio podrán ser publicados en revistas científicas de ámbito nacional e internacional, así como ser comunicados en congresos científicos, siempre garantizando la confidencialidad de los datos.

La persona encargada de facilitarle información adicional sobre el estudio será la Dra. Carmen Cuadrado Mangas, con quién podrán ponerse en contacto llamando al número de teléfono 917277000 (Ext. 1919).

CONSENTIMIENTO FIRMADO ESCRITO

Título del proyecto de investigación: “Hormona anti-Mülleriana
como marcador de reserva ovárica”

Promotora: Dra. M. Carmen Cuadrado Mangas

Investigadora principal: Dra. Iria Aparicio Rodríguez

Yo, (Nombre y Apellidos)

.....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

Dra. Carmen Cuadrado Mangas

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

FIRMA DE LA PARTICIPANTE

FIRMA DEL INVESTIGADOR

Fecha:

Fecha:

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Massagué J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:169-78.
- (2) Jost A. Recherches sur la differenciation sexuelle de l'embryon de lapin. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 1947;36:271-315.
- (3) Munsternberg A, Novell-Badge R. Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 1991;113:613-24.
- (4) Visser JA, McLuskey A, Verhoef-Post M, Kramer P, Grootegeed JA, Themmen AP. Effect of prenatal exposure to diethylstilbestrol on Müllerian duct development in fetal male mice. *Endocrinology* 1998;139:4244-51.
- (5) Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Graem N, Müller J, Cate RL, Skakkebaek NE. Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3836-44.
- (6) Durlinger AL, Grujters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW et al. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 143, 1076-1084. 2002.
- (7) Jost A. Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Prog Horm Res* 1953;8:379-418.
- (8) Picon R. Action du testicule foetal sur le développement in Vitro des canaux de Müller chez le rat. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 1969;58:1-19.
- (9) Josso N. Permeability of membranes to Müllerian inhibiting substance synthesized by the human fetal testis in vitro: a clue to its biochemical nature. *J Clin Endocrinol Metab* 1972;34:265-72.
- (10) Josso N, Forest MG, Picard JY. Müllerian – inhibiting activity of calf fetal testes: relationship to testosterone and protein synthesis. *Biol Reprod* 1975;13:163-7.
- (11) Picard JY, Tran D, Josso N.. Biosynthesis of labelled anti-Müllerian hormone by fetal testes: evidence for the glycoprotein nature of the hormone and for its disulfide-bonded structure. *Mol Cell Endocrinol* 1978;12:17-30.
- (12) Picard JY, Josso N.. Purification of testicular anti-Müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. *Mol Cell Endocrinol* 1984;34:23-9.

-
- (13) Picard JY, Benarous R, Guerrier D, Josso N, Kahn A.. Cloning and expression of cDNA for anti-Müllerian hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:5464-8.
 - (14) Cate RL, Ninfa EG, Pratt DJ, MacLaughlin DT, Donahoe PK.. Development of Müllerian inhibiting substance as an anticancer drug. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51:641-7.
 - (15) Donahoe PK, Cate RL, MacLaughlin DT, Epstein J, Fuller AF, Takahashi M. Müllerian inhibiting substance: gene structure and mechanism of action of a fetal regressor. *Recent Prog Horm Res* 1987;43:431-67.
 - (16) Josso N. Anti-Müllerian hormone: new perspectives for a sexist molecule. *Endocr Rev* 1986;7:421-33.
 - (17) MacLaughlin DT, Epstein J, Donahoe PK. Bioassay, purification, cloning, and expression of Müllerian inhibiting substance. *Methods Enzymol* 1991;198:358-69.
 - (18) Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A et al. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 1986;45:685-98.
 - (19) Picon R. Modifications, chez le rat, au cours du développement du testicule. De son action inhibitrice sur le canaux de Müller in vitro. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1970;271:2370-2.
 - (20) Josso N. Interspecific carácter of the Müllerian-inhibiting substance: action of the human fetal testis , ovary and adrenal on the fetal rat Müllerian duct in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1971;32:404-9.
 - (21) Donahoe PK, Ito Y, Morikawa Y, Hendren WH. Müllerian inhibiting substance in human testes after birth. *J Pediatr Surg* 1977;12:323-330.
 - (22) Donahoe PK, Ito Y, Price JM, Hendren WH 3rd. Müllerian inhibiting substance activity in bovine fetal, newborn and prepuberal testes. *Biol Reprod* 1977;16:238-43.
 - (23) Vigier B, Tran D, du Mesnil du Buisson F, Heyman Y, Josso N. Use of monoclonal antibody techniques to study the ontogeny of bovine anti-Müllerian hormone. *L Reprod Fertil* 1983;69:207-14.
 - (24) Tran D, Picard JY, Campargue J, Josso N. Immunocytochemical detection of anti-Müllerian hormone in Sertoli cells of various mammalian species, including man. *J Histochem Cytochem* 1987;35:733-43.

-
- (25) Baker ML, Metcalfe SA, Hutson JM. Serum levels of Müllerian inhibiting substance in boys from birth to 18 years, as determined by enzyme immunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 70, 11-15. 1990.
- (26) Hudson PL, Dougas I, Donahoe PK, Cate RL, Epstein J, Pepinsky RB et al. An immunoassay to detect human Müllerian inhibiting substance in males and females during normal development. *J Clin Endocrinol Metab* 70, 16-22. 1990.
- (27) Josso N, Legeai L, Forest MG, Chaussain JL, Brauner R. An enzyme linked immunoassay for anti-Müllerian hormone: a new tool for the evaluation of testicular function in infants and children. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:23-7.
- (28) Vigier B, Picard JY, Tran D, Legeai L, Josso N. Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology* 1984;114:1315-20.
- (29) Takahashi M, Hayashi M, Manganaro TF, Donahoe PK. The ontogeny of Müllerian inhibiting substance in granulosa cells of the bovine ovarian follicle. *Biol Reprod* 1986;35:447-53.
- (30) Bézard J, Vigier B, Tran D, Mauléon P, Josso N. Immunocytochemical study of anti-Müllerian hormone in sheep ovarian follicles during fetal and postnatal development. *Reprod Fertil* 1987;80:509-516.
- (31) Ueno S, Kuroda T, Maclaughlin DT, Ragin RC, Manganaro TF, Donahoe PK et al. Müllerian inhibiting substance in the adult rat during various stages of the estrous cycle. *Endocrinology* 1989;125:1060-6.
- (32) Massagué J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:597-641.
- (33) Liu MA, Oliff A. Transforming Growth factor-beta- Müllerian inhibiting substance family of growth regulators. *Cancer Invest* 1991;9:325-36.
- (34) Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK et al. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal end transforming cells. *Nature* 1985;318:659-63.
- (35) Mason AJ, Hayflick JS, Ling N, Esch F, Ueno N, Ying SY et al. Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor beta. *Nature* 1985;318:659-63.
- (36) Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M et al. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 1986;321:779-82.

-
- (37) Vale W, Rivier J, Vaughan J, McClintock R, Corrigan A, Woo W et al. Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* 1986;321:776-8.
 - (38) Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988;242:1528-34.
 - (39) Padgett RW, St Johnston RD, Gelbart WM et al. A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family. *Nature* 1987;325:81-4.
 - (40) Gelbart WM, Irish VF, St Johnston RD, Hoffmann FM, Blackman RK, Segal D et al. The decapentaplegic gene complex in *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1985;50:119-25.
 - (41) Weeks DL, Melton DA. A maternal mRNA localized to the vegetal hemisphere in *Xenopus* eggs codes for a growth factor related to TGF-beta. *Cell* 1987;51:861-7.
 - (42) Lyons K, Graycar JL, Lee A, Hashmi S, Lindquist PB, Chen EY et al. Vgr-1, a mammalian gene related to *Xenopus* Vg-1, is a member of the transforming growth factor beta gene superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:4554-4558.
 - (43) Lee SJ. Identification of a novel member (GDF-1) of the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Endocrinol* 1990;4:1034-40.
 - (44) Budzik GP, Powell SM, Kamagata S, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance fractionation by dye affinity chromatography. *Cell* 1983;34:307-14.
 - (45) Budzik GP, Donahoe PK, Hutson JM. A possible purification of Müllerian inhibiting substance and a model for its mechanism of action. In: Lash JW y Saxèn L, editor. *Developmental mechanisms, normal and abnormal: progress in clinical and biological research*. 1985. p. 207-23.
 - (46) Lorenzo HK, Teixeira J, Pahlavan N, Laurich VM, Donahoe PK, MacLaughlin DT. New approaches for high-yield purification of Müllerian inhibiting substance improve its bioactivity. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;766:89-98.
 - (47) Picard JY, Goulut C, Bourrillon R, Josso N. Biochemical analysis of bovine testicular anti-Müllerian hormone. *FEBS Lett* 1986;195:73-76.
 - (48) Pepinsky RB, Sinclair LK, Chow EP, Mattaliano RJ, Manganaro TF, Donahoe PK et al. Proteolytic processing of Müllerian inhibiting substance produces a transforming growth factor-beta-like fragment. *J Biol Chem* 1988;263:18981-18986.

-
- (49) Wallen JW, Cate RL, Kiefer DM, Riemen MW, Martinez D, Hoffman RM et al. A Minimal anti-proliferative effect of recombinant Müllerian inhibiting substance on gynaecological tumor cell lines and tumor explants. *Cancer Res* 1989;49:2005-2011.
 - (50) Kaufman RJ, Wasley LC, Spiliotes AJ, Gossels SD, Latt SA, Larsen GR et al. Coamplification and coexpression of human tissue-type plasminogen activator and murine dihydrofolate reductase sequences in Chinese Hamster ovary cell. *Mol Cell Biol* 1985;5:1750-9.
 - (51) Donahoe PK, Budzik GP, Trelstad R, Mudgett-Hunter M, Fuller A Jr, Hutson JM et al. Müllerian inhibiting substance: an update. *Recent Prog Horm Res* 1982;38:279-330.
 - (52) Münsterberg A, Lovell-Badge R. Expression of the mouse anti-Müllerian gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 1991;113:613-24.
 - (53) Haqq C, Lee MM, Tizard R, Wysk M, DeMarinis J, Donahoe PK et al. Isolation of the rat gene for Müllerian inhibiting substance. *Genomics* 1992;12:665-9.
 - (54) Kanehisa MI. Use of statistical criteria for screening potential homologies in nucleic acid sequences. *Nucleic Acids Res* 1984;12:203-13.
 - (55) Gelbart WM. The decapentaplegic gene. A TGF-beta homologue controlling pattern formation in *Drosophila*. *Development* 1989;107:65-74.
 - (56) Ragin RC, Donahoe PK, Kenneally MK, Ahmad MF, MacLaughlin DT. Human Müllerian inhibiting substance: enhanced purification imparts biochemical stability and restores antiproliferative effects. *Protein Expression Purif* 1992;3:236-45.
 - (57) Nachtigal MW, Ingraham HA. Bioactivation of Müllerian inhibiting substance during gonadal development by a kex2/ subtilisin-like endoprotease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7711-6.
 - (58) Di Clemente N. 1992.
 - (59) Wilson CA, di Clemente N, Ehrenfels C, Pepinsky RB, Josso N, Vigier B et al. Müllerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Endocrinol* 1993;7:245-57.
 - (60) Wakefield LM, Smith DM, Flanders KC, Sporn MB. Latent transforming growth factor-beta from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences. *J Biol Chem* 1988;263:7646-54.

-
- (61) Gray AM, Mason AJ. Requirement for activin A and transforming growth factor-beta1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* 1990;247:1328-30.
 - (62) Cate RL . Müllerian inhibiting substance. In: Sporn MB RA, editor. *Peptide Growth Factors and their Receptors II. Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin: 1990. p. 179-210.
 - (63) Massagué J, Chen YG. Controlling TGF- β signaling. *Gene Dev* 2000;14:627-44.
 - (64) Baarends WM, van Helmond MJ, Post M, van der Schoot PJ, Hoogerbrugge JW, de Winter JP et al. A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the müllerian duct. *Development* 1994;120:189-97.
 - (65) di Clemente N, Wilson C, Faure E, Boussin L, Carmillo P, Tizard R et al. Cloning, expression and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone. *Mol Endocrinol* 1994;8:1006-20.
 - (66) Imbeaud S, Faure E, Lamarre I, Mattéi MG, di Clemente N, Tizard R et al. Insensitivity to anti-Müllerian hormone due to a spontaneous mutation in the human anti-Müllerian hormone receptor. *Nat Genet* 1995;11:382-8.
 - (67) Allard S, Adin P, Gouédard L, di Clemente N, Josso N, Orgebin-Crist MC et al. Molecular mechanisms of hormone-mediated Müllerian duct regression: involvement of β -catenin. *Development* 2000;127:3349-60.
 - (68) Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, van Leeuwen EC, Themmen AP et al. Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology* 1995;136:4951-62.
 - (69) Baarends WM, Hoogerbrugge JW, Post M, Visser JA, De Rooij DG, Parvinen M et al. Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression during postnatal testis development and in the adult testis of the rat. *Endocrinology* 1995;136:5614-22.
 - (70) Racine C, Rey R, Forest MG, Louis F, Ferré A, Huhtaniemi I et al. Receptors for anti-Müllerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:594-9.
 - (71) Faure E, Gouédard L, Imbeaud S, Cate R, Picard JY, Josso N et al. Mutant isoforms of the anti-Müllerian hormone type II receptor are not expressed at the cell membrane. *J Biol Chem* 1996;271:30571-5.

-
- (72) Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL. Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 1994;79:415-25.
- (73) Mishina Y, Rey R, Finegold MJ, Matzuk MM, Josso N, Cate RL et al. Genetic analysis of the Müllerian-inhibiting substance signal transduction pathway. *Genes Dev* 1996;10:2577-87.
- (74) Gouédard L, Chen YG, Thevenet L, Racine C, Borie S, Lamarre I et al. Engagement of bone morphogenetic protein type IB receptor and Smad1 signaling by anti-Müllerian hormone and its type II receptor. *J Biol Chem* 2000;275:27973-8.
- (75) Imbeaud S, Faure E, Lamarre I, Mattéi MG, di Clemente N, Tizard R et al. Insensitivity to anti-Müllerian hormone due to a spontaneous mutation in the human anti-Müllerian hormone receptor. *Nat Genet* 1995;11:382-8.
- (76) Visser JA, Olaso R, Verhoef-Post M, Kramer P, Themmen AP, Ingraham HA. The serine/threonine transmembrane receptor ALK2 mediates Mullerian inhibiting substance signaling. *Mol Endocrinol* 2001;15:936-45.
- (77) Jamin SP, Arango NA, Mishina Y, Hanks MC, Behringer RR. Requirement of BMPR-IA for Müllerian duct regression during male sexual development. *Nat Genet* 2002;32:408-10.
- (78) Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 1999;397:405-9.
- (79) Parr BA, McMahon AP. Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature* 1998;395:707-10.
- (80) Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction* 2002;124:601-9.
- (81) Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA et al. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004;10:77-83.
- (82) Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA et al. Durlinger AL KPKBea. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 1999;140:5789-96.
- (83) Durlinger AL. Ovarian follicle growth and development: role of anti-Müllerian hormone Faculty of medicine and health sciences, Erasmus, Rotterdam; 2000.

-
- (84) Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM et al. Anti-müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001;142:4891-9.
- (85) Hale GE. Endocrine features of menstrual cycles in middle and late reproductive age and the menopausal transition classified according to the Stagin of Reproductive Aging Workshop staging system. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3060-7.
- (86) Laven JS. Anti-Müllerian hormone serum concentrations in normoovulatory and anovulatory women of reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:318-23.
- (87) Pigny P, Jonard S, Robert Y, Dewailly D. Serum anti-Müllerian hormone as a surrogate for antral follicle count for definition of the polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:941-5.
- (88) Bath LE, Wallace WH, Shaw MP, Fitzpatrick C, Anderson RA. Depletion of ovarian reserve in young women after treatment for cancer in childhood : detection by anti-Müllerian hormone, inhibin B and ovarian ultrasound. *Hum Reprod* 2003;18:2368-74.
- (89) Anderson RA. The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. *Hum Reprod* 2008;21:2583-92.
- (90) Lie Fong S, Lugtenburg PJ, Schipper I, Themmen AP, de Jong FH, Sonneveld P et al. Anti-mullerian hormone as a marker of ovarian function in women after chemotherapy and radiotherapy for haematological malignancies. *Hum Reprod* 2008;23:674-8.
- (91) Rohr J, Allen EG, Charen K, Giles J, He W, Dominguez C et al. Anti-Müllerian hormone indicates early ovarian decline in fragile X mental retardation (FMR1) premutation carriers: a preliminary study. *Hum Reprod* 2008;23:1220-1225.
- (92) Giuseppe J. Ovarian function after cancer treatment in young women affected by Hodgkin disease (HD). *Hematology* 2007;12:141-7.
- (93) La Marca A, Pati M, Orvieto R, Stabile G, Carducci Arsenio A, Volpe A. Serum anti-müllerian hormone levels in women with secondary amenorrhea. *Fertil Steril* 2006;85:1547-9.
- (94) Méduri G, Massin N, Guibourdenche J, Bachelot A, Fiori O, Kuttann F et al. Serum anti-Müllerian hormone expression in women with premature ovarian failure. *Hum Reprod* 2007;22:117-23.
- (95) Fasouliotis SJ, Simon A, Laufer N. Evaluation and treatment of low responders in assisted reproductive technology. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:357-73.

-
- (96) te Velde ER, Pearson PL. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update* 2002;8:141-54.
- (97) Tarlatzis BC, Zepiridis L, Grimbizis G, Bontis J. Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2003;9:61-76.
- (98) Block E. Quantitative morphological investigations of follicular system in women. Variations at different ages. *Acta Anat (Basel)* 1954;14(suppl 16):108-23.
- (99) Gülekli B, Bulbul Y, Onvural A, Yorukoglu K, Posaci C, Demir N et al. Accuracy of ovarian reserve tests. *Hum Reprod* 1999;14:2822-6.
- (100) Deeks JJ. Systematic reviews in health care: systematic reviews of evaluation of diagnostic and screening tests. *Br Medical Journal* 2001;323:157-62.
- (101) Grimes DA, Schulz KF. Refining clinical diagnosis with likelihood ratios. *Lancet* 2005;365:1500-5.
- (102) Smeenk JM, Stolwijk AM, Kremer JA, Braat DD. Smeenk JM SAKJea. External validation of the Templeton model for predicting succes after IVF. *Hum Reprod* 2000;15:1065-8.
- (103) Stolwijk AM, Zielhuis GA, Hamilton CJ, Straatman H, Hollanders JM, Goverde HJ et al. Prognostic models for the probability of acheiving an ongoing pregnancy after in-vitro fertilization and the importance of testing their predictive value. *Hum Reprod* 1996;11:2298-303.
- (104) van Rooij IA, Broekmans FJ, Hunault CC, Scheffer GJ, Eijkemans MJ, de Jong FH et al. The use of ovarian reserve tests for the prediction of ongoing pregnancy in couples with unexplained female infertility. *Reprod Biomed Online* 2006;12:182-90.
- (105) Pellicer A, Lightman A, Diamond MP, Russell JB, DeCherney AH. Outcome of in vitro fertilization in women with low response to ovarian stimulation. *Fertil Steril* 1987;47:812-5.
- (106) Scott RT, Opsahl MS, Leonardi MR, Neall GS, Illions EH, Navot D. Life table analysis of pregnancy rates in a general infertility population relative to ovarian reserve and patient age. *Hum Reprod* 1995;10:1706-10.
- (107) Gougeon A, Ecochard R, Thalabard JC. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. *Biol Reprod* 1994;50:653-63.
- (108) Faddy MJ, Gosden RG. A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. *Hum Reprod* 1996;11:1484-6.

-
- (109) Richardson SJ, Senikas V, Nelson JF. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65:1231-7.
- (110) Scott RT Jr, Hofmann GE. Prognostic assesment of ovarian reserve. *Fertil Steril* 1995;63:1-11.
- (111) Gosden RG. Follicular status at the menopause. *Hum Reprod* 1987;2:617-21.
- (112) te Velde ER. Disappearing ovarian follicles and reproductive ageing. *Lancet* 1993;341:1125-6.
- (113) Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A sistematic review of tests predicting ovarian reserve. *Hum Reprod Update* 2006;12(6):685-718.
- (114) Muasher SJ, Oehninger S, Simonetti S, Matta J, Ellis LM, Liu HC et al. The value of basal and/or stimulated serum gonadotropin levels in prediction of stimulation response and in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1988;50:298-307.
- (115) Scott RT, Toner JP, Muasher SJ, Oehninger S, Robinson S, Rosenwaks Z et al. Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1989;51:651-4.
- (116) Toner JP, Philput CB, Jones GS, Muasher SJ. Basal follicle-stimulating hormone level is a better predictor of in vitro fertilization performance than age. *Fertil Steril* 1991;55:784-91.
- (117) Levi AJ, Raynault MF, Bergh PA, Drews MR, Miller BT, Scott RT Jr. Reproductive outcome in patients with diminished ovarian reserve. *Fertil Steril* 2001;76:666-9.
- (118) Sharif K, Elgendy M, Lashen H, Afnan M. Sharif K EMLHea. Age and basal follicle stimulating hormone as predictors of in vitro fertilization outcome. *Br J Obstet Gynaecol* 1998;105:107-12.
- (119) Creus M, Peñarrubia J, Fábregues F, Vidal E, Carmona F, Casamitjana R et al. Day 3 serum inhibin B and FSH and age as predictors of assisted reproduction treatment outcome. *Hum Reprod* 2000;15:2341-6.
- (120) Hanoch J, Lavy Y, Holzer H, Hurwitz A, Simon A, Revel A et al. Young low responders protected from untoward effects of reduced ovarian response. *Fertil Steril* 1998;69:1001-4.
- (121) El-Toukhy T, Khalaf Y, Hart R, Taylor A, Braude P. Young age does not protect against the adverse effects of reduced ovarian reserve-an eight year study. *Hum Reprod* 2002;17:1519-24.

-
- (122) Chuang CC, Chen CD, Chao KH, Chen SU, Ho HN, Yang YS. Age is a better predictor of pregnancy potential than basal follicle-stimulating hormone levels in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2003;79:63-8.
- (123) van Rooij IA, Bancsi LF, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. Women older than 40 years of age and those with elevated Follicle-stimulating hormone levels differ in poor response rate and embryo quality in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2003;79:482-8.
- (124) van Rooij IA, de Jong E, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. High follicle stimulating hormones levels should not lead to the exclusion of subfertile patients from treatment. *Fertil Steril* 2004;81:1478-85.
- (125) Bancsi LF, Broekmans FJ, Mol BW, Habbema JD, te Velde ER. Performance of basal follicle-stimulating hormone in the prediction of poor ovarian response and failure to become pregnant after in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2003;79:1091-100.
- (126) van Montfrans JM, Hoek A, van Hooff MH, de Koning CH, Tonch N, Lambalk CB. Predictive value of basal follicle-stimulating hormone concentrations in a general subfertile population. *Fertil Steril* 2000;74:97-103.
- (127) Scott RT Jr, Hofmann GE, Oehninger S, Muasher SJ. Intercycle variability of day 3 follicle-stimulating hormone levels and its effect on stimulation quality in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1990;54:297-302.
- (128) Scott R.T. Diminished ovarian reserve and access to care. *Fertil Steril* 2004;81:1489-92.
- (129) Bukulmez O, Arici A. Assessment of ovarian reserve. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004;16:231-7.
- (130) Barnhart K, Osheroff J. Follicle-stimulating hormone as a predictor of fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1998;10:227-32.
- (131) Barnhart K, Osheroff J. We are overinterpreting the predictive value of serum follicle-stimulating hormone levels. *Fertil Steril* 1999;72:8-9.
- (132) Roberts JE, Spandorfer S, Fasouliotis SJ, Kashyap S, Rosenwaks Z. Taking a basal follicle-stimulating hormone history is essential before initiating in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2005;83:37-41.
- (133) Licciardi FL, Liu HC, Rosenwaks Z. Day 3 estradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1995;64:991-4.

-
- (134) Smotrich DB, Widra EA, Gindoff PR, Levy MJ, Hall JL, Stillman RJ. Prognostic value of day 3 estradiol on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1995;64:1136-40.
- (135) Evers JL, Slaats P, Land JA, Dumoulin JC, Dunselman GA. Elevated levels of basal estradiol-17beta predict poor response in patients with normal basal levels of follicle-stimulating hormone undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998;69:1010-4.
- (136) Frattarelli JL, Bergh PA, Drews MR, Sharara FI, Scott RT. Evaluation of basal estradiol levels in assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 2000;74:518-24.
- (137) Ranieri DM, Phophong P, Khadum I, Meo F, Davis C, Serhal P. Simultaneous evaluation of basal FSH and oestradiol response to GnRH analogue (F-G-test) allows effective drug regimen selection for IVF. *Hum Reprod* 2001;16:673-5.
- (138) Bancsi LF, Broekmans FJ, Eijkemans MJ, de Jong FH, Habbema JD, te Velde ER. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2002;77:328-33.
- (139) Hall JE, Welt CK, Cramer DW. Inhibin A and Inhibin B reflect ovarian function in assisted reproduction but are less useful at predicting outcome. *Hum Reprod* 1999;14:409-15.
- (140) Phophong P, Ranieri DM, Khadum I, Meo F, Serhal P. Basal 17beta estradiol did not correlate with ovarian response and in vitro fertilization treatment outcome. *Fertil Steril* 2000;74:1133-6.
- (141) Mikkelsen AL. Basal concentrations of oestradiol may predict the outcome of in vitro maturation in regularly menstruating women. *Hum Reprod* 2000;16:862-7.
- (142) Peñarrubia J, Balasch J, Fábregues F, Carmona F, Casamitjana R, Moreno V et al. Day 5 Inhibin B serum concentrations as predictors of assisted reproductive technology outcome in cycles stimulated with gonadotrophin -releasing hormone agonist-gonadotrophin treatment. *Hum Reprod* 2000;15:1499-504.
- (143) Lockwood GM, Muttukrishna S, Groome NP, Matthews DR, Ledger WL. Mid-follicular phase pulses of inhibin are absent in polycystic ovarian syndrome and are initiated by successful laparoscopic ovarian diathermy: a possible mechanism regulating emergence of the dominant follicle. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1730-5.
- (144) Klein NA, Illingworth PJ, Groome NP, McNeilly AS, Battaglia DE, Soules MR. Decreased Inhibin B secretion is associated with the monotropic FSH rise in older, anovulatory women: a study of serum and follicular fluid levels of dimeric inhibin A and B spontaneous menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2742-5.

-
- (145) Roberts VJ, Barth S, el-Roeiy A, Yen SS. Expression of inhibin/ activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1402-10.
- (146) Muttukrishna S, Fowler PA, Groome NP, Mitchell GG, Robertson WR, Knight PG. Serum concentrations of dimeric inhibin during the spontaneous human menstrual cycle and after treatment with exogenous gonadotrophin. *Hum Reprod* 1994;9:1634-2.
- (147) Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R, Rodger FE, Mather JP et al. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1401-5.
- (148) Burger HG, Groome NP, Robertson DM. Both inhibin A and B respond to exogenous follicle-stimulating hormone in the follicular phase of the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4167-9.
- (149) Seifer DB, Lambert-Messerlian G, Hogan JW, Gardiner AC, Blazar AS, Berk CA. Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertil Steril* 1997;67:110-4.
- (150) Fişicioğlu C, Kutlu T, Demirbaşoğlu S, Mulayim B. The role of inhibin B as a basal determinant of ovarian reserve. *Gynecol Endocrinol* 2003;17:287-93.
- (151) Erdem M, Erdem A, Gursoy R, Biberoglu K. Comparison of basal and clomiphene citrate induced FSH and inhibin B, ovarian volume and antral follicle counts as ovarian reserve tests and predictors of poor ovarian response in IVF. *J Assist Reprod Genet* 2004;21:37-45.
- (152) Fábregues F, Balasch J, Creus M, Carmona F, Puerto B, Quintó L et al. Ovarian reserve test with human menopausal gonadotropin as a predictor of in vitro fertilization outcome. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:13-9.
- (153) Balasch J, Creus M, Fábregues F, Carmona F, Casamitjana R, Ascaso C et al. Inhibin, follicle-stimulating hormone and age as predictors of ovarian response in in-vitro fertilization cycles stimulated with gonadotrophin-releasing hormone agonist -gonadotrophin treatment. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:1226-30.
- (154) Messinis IE, Templeton A. In vivo bioactivity of gonadotrophin surge attenuating factor. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1990;33:213-8.
- (155) Messinis IE, Templeton A. Attenuation of gonadotrophin release and reserve in superovulated women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1991;34:259-63.
- (156) Martinez F, Barri PN, Coroleu B, Tur R, Sorsa-Leslie T, Harris WJ et al. Women with poor response to IVF have lowered circulating

- gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF) bioactivity during spontaneous and stimulated cycles. *Hum Reprod* 2002;17:634-40.
- (157) Fowler PA, Sorsa-Leslie T, Harris W, Mason HD. Ovarian gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF): where are we after 20 years of research? *Reproduction* 2003;126:689-99.
- (158) Fowler PA, Spears N. The cultured rodent follicle as a model for investigations of gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF) production. *Reproduction* 2004;127:679-88.
- (159) Karligioutou E, Kollia P, Kallitsaris A, Messinis IE. Expression of human serum albumin (HSA) mRNA in human granulosa cells: potential correlation of the 95 amino acid long carboxyl terminal of HSA to gonadotrophin surge-attenuating factor. *Hum Reprod* 2006;21:645-50.
- (160) Sharara FI, Scott RT Jr, Seifer DB. The detection of diminished ovarian reserve in infertile women. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:804-12.
- (161) Padilla SL, Bayati J, Garcia JE. Prognostic value of the early serum estradiol response to leuprolide acetate in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1990;53:288-94.
- (162) Ranieri DM, Quinn F, Makhoulouf A, Khadum I, Ghutmi W, McGarrigle H et al. Simultaneous evaluation of basal follicle-stimulating hormone and 17 beta-estradiol response to gonadotropin-releasing hormone analogue stimulation: an improved predictor of ovarian reserve. *Fertil Steril* 1998;70:227-33.
- (163) Hendriks DJ, Broekmans FJ, Bancsi LF, Looman CW, de Jong FH, te Velde ER. Single and repeated GnRH agonist stimulation tests compared with basal markers of ovarian reserve in the prediction of outcome in IVF. *J Assist Reprod Genet* 2005;22:65-73.
- (164) Winslow KL. The gonadotrophin-releasing hormone agonist stimulation test- a sensitive predictor of performance in the flare-up in in-vitro fertilization cycle. *Fertil Steril* 1999;56:711-7.
- (165) Loumaye E, Billion JM, Mine JM, Psalti I, Pensis M, Thomas K. Prediction of individual response to controlled ovarian hyperstimulation by means of a clomiphene citrate challenge test. *Fertil Steril* 1990;53:295-301.
- (166) Csemiczky G, Harlin J, Fried G. Predictive power of clomiphene citrate challenge test for failure of in vitro fertilization treatment. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002;81:954-61.
- (167) Yanushpolsky EH, Hurwitz S, Tikh E, Racowsky C. Predictive usefulness of cycle day 10 follicle-stimulating hormone level in a clomiphene citrate challenge test for in vitro fertilization outcome in women younger than 40 years of age. *Fertil Steril* 2003;80:111-5.

-
- (168) Kwee J, Elting MW, Schats R, Bezemer PD, Lambalk CB, Schoemaker J. Comparison of endocrine tests with respect to their predictive value on the outcome of ovarian hyperstimulation in IVF treatment: results of a prospective randomized study. *Hum Reprod* 2003;18:1422-7.
- (169) Hendriks DJ, Broekmans FJ, Bancsi LF, de Jong FH, Looman CW, Te Velde ER. Repeated clomiphene citrate challenge testing in the prediction of outcome in IVF: a comparison with basal markers for ovarian reserve. *Hum Reprod* 2005;20:163-9.
- (170) Tanbo T, Dale PO, Abyholm T, Stokke KT. Follicle-stimulating hormone as a prognostic indicator in clomiphene citrate/ human menopausal gonadotrophine stimulated ccles for in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1989;4:647-50.
- (171) Tanbo T, Abyholm T, Bjørø T, Dale PO. Ovarian stimulation in previous failures from in-vitro fertilization: distinction of two groups of poor responders. *Hum Reprod* 1990;5:811-5.
- (172) Tanbo T, Dale PO, Lunde O, Norman N, Abyholm T. Prediction of response to controlled ovarian hyperstimulation: a comparison of basal and clomiphene citrate-stimulated follicle-stimulating hormone levels. *Fertil Steril* 1992;57:819-24.
- (173) Kahraman S, Vicdan K, Işık AZ, Özgün OD, Alaybeyoğlu L, Polat G et al. Clomiphene citrate challenge test in the assesement of ovarian reserve before controlled ovarian hyperstimulation for intracytoplasmic sperm injection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997;73:177-82.
- (174) van der Stege JG, van der Linden PJ. Useful predictors of ovarian stimulation response in women undergoing in vitro fertilization. *Gynecol Obstet Invest* 2001;52:43-6.
- (175) Csemiczky G, Wramsby H, Landgren BM. Luteal phase oestradiol and progesterone levels are stronger predictors than follicular phase follicle-stimulating hormone for the outcomo of in-vitro fertilization treatment in women with tubal infertility. *Hum Reprod* 1996;11:2396-9.
- (176) Jain T, Soules MR, Collins JA. Comparison of basal follicle-stimulating hormone versus the clomiphene citrate challenge test for ovarian reserve screening. *Fertil Steril* 2004;82:180-5.
- (177) Hendriks DJ, Mol BW, Bancsi LF, Te Velde ER, Broekmans FJ. Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone levels. *Fertil Steril* 2005;83:291-301.
- (178) Fanchin R, de Ziegler D, Olivennes F, Taieb J, Dzik A, Frydman R. Exogenous follicle stimulating hormone ovarian reserve test (EFORT): a simple and reliable screening test for detecting "poor responders" in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1994;9:1607-11.

-
- (179) Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod* 1992;7:1342-6.
- (180) Ivarsson SA, Nilsson KO, Persson PH. Ultrasonography of the pelvis organs in prepubertal and postpubertal girls. *Arch Dis Child* 1983;58:352-4.
- (181) Christensen JT, Boldsen J, Westergaard JG. Ovarian volume in gynecologically healthy women using no contraception, or using IUD or oral contraception. *Acta Obstet Gynecol Scan* 1997;76:784-9.
- (182) Ng EH, Yeung WS, Fong DY, Ho PC. Effects of age on hormonal and ultrasound markers of ovarian reserve in Chinese women with proven fertility. *Hum Reprod* 2003;18:2169-74.
- (183) Andolf E, Jörgensen C, Svalenius E, Sundén B. Ultrasound measurement of the ovarian volume. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1987;66:387-9.
- (184) Pavlik EJ, DePriest PD, Gallion HH, Ueland FR, Reedy MB, Kryscio RJ et al. Ovarian volume related to age. *Gynecol Oncol* 2000;77:410-2.
- (185) Syrop CH, Willhoite A, Van Voorhis BJ. Ovarian volume: a novel outcome predictor for assisted reproduction. *Fertil Steril* 1995;64:1167-71.
- (186) Lass A, Skull J, McVeigh E, Margara R, Winston RM. Measurement of ovarian volume by transvaginal sonography before ovulation induction with human menopausal gonadotrophin for in-vitro fertilization can predict poor response. *Hum Reprod* 1997;12:294-7.
- (187) Frattarelli JL, Lauria-Costab DF, Miller BT, Bergh PA, Scott RT. Basal antral follicle number and mean ovarian diameter predict cycle cancelation and ovarian responsiveness in assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 2000;74:512-7.
- (188) Jarvela IY. Quantification of ovarian power doppler signal with three-dimensional ultrasonography to predict response during in vitro fertilization. *Obstet Gynecol* 2003;102:816-22.
- (189) Kupesic S, Kurjak A, Bjelos D, Vujisic S. Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro fertilization outcome are related to age. *Fertil Steril* 2003;79:190-7.
- (190) Schild RL, Knobloch C, Dorn C, Fimmers R, van der Ven H, Hansmann M. The role of ovarian volume in an in-vitro fertilization programme as assessed by 3D ultrasound. *Arch Gynecol Obstet* 2001;265:67-72.

-
- (191) Sharara FI, McClamrock HD. The effect of aging on ovarian volume measurements in infertile women. *Obstet Gynecol* 1999;94:57-60.
- (192) Ruess ML, Kline J, Santos R, Levin B, Timor-Tritsch I. Age and the ovarian follicle pool assessed with transvaginal ultrasonography. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:624-7.
- (193) Scheffer GJ, Broekmans FJ, Dorland M, Habbema JD, Looman CW, te Velde ER. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil Steril* 1999;72:845-51.
- (194) Chang MY, Chiang CH, Hsieh TT, Soong YK, Hsu KH. Use of the antral follicle count to predict the outcome of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 1998;69:505-10.
- (195) Ng EH, Tang OS, Ho PC. The significance of the number of antral follicles prior to stimulation in predicting ovarian responses in an IVF programme. *Hum Reprod* 2000;15:1937-42.
- (196) Hsieh YY, Chang CC, Tsai HD. Antral follicle counting in predicting the retrieved oocyte number after ovarian hyperstimulation. *J Assist Reprod Genet* 2001;18:320-4.
- (197) Nahum R, Shifren JL, Chang Y, Leykin L, Isaacson K, Toth TL. Antral follicle assesment as a tool for predicting outcome in IVF- is it a better predictor than age and FSH? *J Assist Reprod Genet* 2001;18:151-5.
- (198) Yong PY, Baird DT, Thong KJ, McNeilly AS, Anderson RA. Prospective analysis of the relationship between the ovarian follicle cohort and basal FSH concentration, the inhibin response to exogenous FSH and ovarian follicle number at different stages of the normal menstrual cycle and after pituitary down-regulation. *Hum Reprod* 2003;18:35-44.
- (199) Sharara FI. Antral follicle count and ovarian volume predict IVF outcome. *Fertil Steril* 2000;S176.
- (200) Erdem A, Erdem M, Biberoglu K, Hayit O, Arslan M, Gursoy R. Age-related changes in ovarian volume, antral follicle counts and basal FSH in women with normal reproductive health. *J Reprod Med* 2002;47:835-9.
- (201) Fisch JD, Sher G. The antral follicle counts (AFC) correlates with the metaphase II oocytes and ART cycles outcome : an update. *Fertil Steril* 2002;78(S90).
- (202) Frattarelli JL, Levi AJ, Miller BT, Segars JH. A prospective assesment of predictive value of basal antral follicles in in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2003;80:350-5.

-
- (203) Durmusoglu F, Elter K, Yoruk P, Erenus M. Combining cycle day 7 follicle count with the basal antral follicle count improves the prediction of ovarian response. *Fertil Steril* 2004;81:1073-8.
- (204) Hendriks DJ. The role of poor response in the prediction of cumulative ongoing pregnancy rate in in vitro fertilization. Dynamic and basal ovarian reserve tests for outcome prediction in IVF: comparisons and meta-analysis. Utrecht: 2005.
- (205) Engmann L, Sladkevicius P, Agrawal R, Bekir J, Campbell S, Tan SL. The pattern of changes in ovarian stromal and uterine artery blood flow velocities during in vitro fertilization treatment and its relationship with outcome of the cycle. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1999;13:26-33.
- (206) Engmann L, Sladkevicius P, Agrawal R, Bekir JS, Campbell S, Tan SL. Value of ovarian stromal blood flow velocity measurement after pituitary suppression in the prediction of ovarian responsiveness and outcome of in vitro fertilization treatment. *Fertil Steril* 1999;71:22-9.
- (207) Kim SH, Ku SY, Jee BC, Suh CS, Moon SY, Lee JY. Clinical significance of transvaginal color doppler ultrasonography of the ovarian artery as a predictor of ovarian response in controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 2002;19:103-12.
- (208) Kupesic S, Kurjak A. Predictors of IVF outcome by three-dimensional ultrasound. *Hum Reprod* 2002;17:950-5.
- (209) Zaidi J, Barber J, Kyei-Mensah A, Bekir J, Campbell S, Tan SL. Relationship of ovarian stromal blood flow at the baseline ultrasound scan to subsequent follicular response in an in vitro fertilization program. *Obstet Gynecol* 1996;88:779-84.
- (210) Popovic-Todorovic B, Loft A, Lindhard A, Bangsbøll S, Andersson AM, Andersen AN. A prospective study of predictive factors of ovarian response of "standard" IVF/ICSI patients treated with recombinant FSH. A suggestion of recombinant FSH dosage normogram. *Hum Reprod* 2003;18:781-7.
- (211) Lass A, Silye R, Abrams DC, Krausz T, Hovatta O, Margara R et al. Follicular density in ovarian biopsy of infertile women: a novel method to assess ovarian reserve. *Hum Reprod* 1997;12:1028-31.
- (212) Lass A. Assessment of ovarian reserve - is there a role for ovarian biopsy? *Hum Reprod* 2001;16:1055-7.
- (213) Qu J, Godin PA, Nisolle M, Donnez J. Distribution and epidermal growth factor expression of primordial follicles in human ovary tissue before and after cryopreservation. *Hum Reprod* 2000;15:302-10.
- (214) Sharara FI, Scott RT. Assessment of ovarian reserve: is there still a role for ovarian biopsy? First do no harm. *Hum Reprod* 2004;19:470-1.

-
- (215) Lambalk CB. Assesement of ovarian reserve. Ovarian biopsy is not a valid method for the prediction of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2008;19:1055-9.
- (216) Schmidt KL, Ernst E, Byskov AG, Nyboe Andersen A, Yding Andersen C. Survival of primordial follicles following prolonged transportation of ovarian tissue prior to cryopreservation. *Hum Reprod* 2003;18:2654-9.
- (217) Muttukrishna S, Suharjono H, McGarrigle H, Sathanandan M. Inhibin B and anti-müllerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? *Br J Obstet Gynaecol* 2004;11:1248-53.
- (218) van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH et al. Serum anti-müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod* 2002;17:101-7.
- (219) Seifer DB, MacLaughlin DT, Christian BP, Feng B, Shelden RM. Early follicular serum müllerian- inhibiting substance levels are associated with ovarian response during assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 2002;77:468-71.
- (220) Fanchin R, Schonäuer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J. Serum antimüllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum Reprod* 2003;18:323-7.
- (221) Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri DM, Serhal P. Antral follicle count, anti-müllerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? *Br J Obstet Gynaecol* 2005;112:1384-90.
- (222) Fanchin R, Schonäuer LM, Righini C, Frydman N, Frydman R, Taieb J. Serum anti müllerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod* 2003;18:328-32.
- (223) Andersen CY, Byskov AG. Estradiol and regulation of antimüllerian hormone, inhibin-A and inhibin-B secretion: analysis of small antral and preovulatory human follicles' fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4064-9.
- (224) Hazout A, Bouchard P, Seifer DB, Aussage P, Junca AM, Cohen-Bacrie P. Serum antimüllerian hormone/müllerian inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of ART outcome than follicular stimulating hormone, inhibin B or estradiol. *Fertil Steril* 2004;82:1323-9.
- (225) Eldar-Geva T, Ben-Chetrit A, Spitz IM, Rabinowitz R, Markowitz E, Mimoni T et al. Dynamic assays of inhibin B, anti-müllerian hormone and estradiol following FSH stimulation and ovarian ultrasonography as predictors of IVF outcome. *Hum Reprod* 2005;20:3178-83.

- (226) Peñarrubia J, Fábregues F, Manau D, Creus M, Casals G, Casamitjana R et al. Basal and stimulation day 5 antimullerian hormone serum concentrations as predictors of ovarian response and pregnancy in assisted reproductive technology cycles stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist-gonadotropin treatment. *Hum Reprod* 2005;20:915-22.
- (227) Fişicioglu C, Kutlu T, Baglam E, Bakacak Z. Early follicular antimullerian hormone as an indicator of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2006;85:592-6.
- (228) Ebner T, Sommergruber M, Moser M, Shebl O, Schreier-Lechner E, Tews G. Basal level anti mullerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles. *Fertil Steril* 2006;85:592-6.
- (229) Silberstein T, MacLaughlin DT, Shai I, Trimarchi JR, Lambert-Messerlian G, Seifer DB et al. Mullerian inhibiting substance levels at the time of hCG administration in IVF cycles predict both ovarian reserve and embryo morphology. *Hum Reprod* 2006;21:159-63.
- (230) Smeenk JM, Sweep FC, Zielhuis GA, Kremer JA, Thomas CM, Braat DD. Antimullerian hormone predicts ovarian responsiveness but not embryo quality or pregnancy , after in viro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2007;87:223-6.
- (231) Gnoth C, Schuring AN, Friol K, Tigges J, Mallmann P, Godehardt E. Relevance of anti-Mullerian hormone measurement in a routine IVF program. *Hum Reprod* 2008;23:1359-65.
- (232) Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA et al. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004;10:77-83.
- (233) Klinkert ER, Broekmans FJ, Looman CW, Te Velde ER. A poor response in the first in vitro fertilization cycles is not necessarily related to a poor prognosis in subsequent cycles. *Fertil Steril* 2004;81:1247-53.
- (234) Garcia-Velasco JA, Isaza V, Requena A, Martínez-Salazar FJ, Landazábal A, Remohí J et al. High dose of gonadotrophins combined with stop versus non-stop protocol of GnRH analogue administration in low responder IVF patients: a prospective, randomized, controlled trial. *Hum Reprod* 2000;15:2292-6.
- (235) Hughes JN, Cedrin Durnerin I. Revisiting gonadotrophin releasing hormone agonist protocols and management of poor ovarian responses to gonadotrophins. *Hum Reprod Update* 1998;4:83-101.
- (236) Gougeon A. Caracteres qualitatifs et quantitatifs de la population folliculaire dans l'ovaire humain adulte. *Contr Fert Sex* 1984;12:527-35.

-
- (237) Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypothesis. *Endocr Rev* 1996;17:121-55.
- (238) Cook CL, Siow Y, Brenner AG, Fallat ME. Relationship between serum Müllerian-inhibiting substance and other reproductive hormones in untreated women with polycystic ovary syndrome and normal women. *Fertil Steril* 2002;77:141-6.
- (239) Hughesdon PE. Morphology and morphogenesis of the Stein-Leventhal ovary and of so-called "hyperthecosis". *Obstet Gynecol Surv* 1982;37:59-77.
- (240) Cook CL, Siow Y, Taylor S, Fallat ME. Serum Müllerian-inhibiting substance levels during normal menstrual cycles. *Fertil Steril* 2000;73:859-61.
- (241) Bancsi LF, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. Impact of repeated antral follicle counts on the prediction of poor ovarian response in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004;81:35-41.
- (242) Dehghani-Firouzabadi R, Tayebi N, Asgharnia M. Serum level of anti-müllerian hormone in early follicular phase as a predictor of ovarian reserve and pregnancy outcome in assisted reproductive technology cycles. *Arch Iran Med* 2008;11:371-6.
- (243) Mais V, Cetel NS, Muse KN, Quigley ME, Reid RL, Yen SS. Hormonal dynamics during luteal-follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64:1109-14.
- (244) Josso N, Racine C, di Clemente N, Rey R, Xavier F. The role of anti-Müllerian hormone in gonadal development. *Mol Cell Endocrinol* 1998;145:3-7.
- (245) La Marca A, Malmusi S, Giulini S, Tamaro LF, Orvieto R, Levratti P et al. Anti-Müllerian hormone plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during treatment with FSH to induce ovulation. *Hum Reprod* 2004;19:2738-41.
- (246) Nakhuda GS, Chu MC, Wang JG, Sauer MV, Lobo RA. Elevated serum müllerian- inhibiting substance may be a marker for ovarian hyperstimulation syndrome in normal women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2006;85:1541-3.
- (247) Broer SL, Willem BJ, Hendriks DJ, Broekmans FJ. The role of antimüllerian hormone in prediction of outcome after IVF: comparison with the antral follicle count . *Fertil Steril* 2008;in press.
- (248) Takahashi C, Fujito A, Kazuka M, Sugiyama R, Ito H, Isaka K. Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2008;89:586-91.

-
- (249) Tremellen KP, Kolo M, Gilmore A, Lekamge DN. Anti-müllerian hormone as a marker of ovarian reserve. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2005;45:20-4.
- (250) Bukman A, Heineman MJ. Ovarian reserve testing and the use of prognostic models in patients with subfertility. *Hum Reprod Update* 2001;7:581-90.
- (251) Nelson SM, Yates RW, Fleming R. Serum anti-Müllerian hormone and FSH: prediction of live birth and extremes of response in stimulated cycles implications for individualization of therapy. *Hum Reprod* 2007;22:2414-21.
- (252) Fanchin R. Anti-Müllerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1796-802.
- (253) Ulug U, Ben-Shlomo I, Turan E, Erden HF, Akman MA, Bahceci M. Conception rates following assisted reproduction in poor responder patients: a retrospective study in 300 consecutive cycles. *Reprod Biomed Online* 2003;6:439-43.
- (254) Klinkert ER, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. Expected poor responders on the basis of an antral follicle count do not benefit from a higher starting dose of gonadotrophins in IVF treatment: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2005;20:611-5.
- (255) Kwee J, Schats R, McDonnell J, Themmen A, de Jong F, Lambalk C. evaluation of anti-Müllerian hormone as a test for the prediction of ovarian reserve. *Fertil Steril* 2008; 90:737-43.
- (256) Fanchin R, Taieb J, Lozano DH, Ducot B, Frydman R, Bouyer J. High reproducibility of serum anti-Müllerian hormone measurements suggests a multi-staged follicular secretion and strengthens its role in the assesement of ovarian follicular status. *Hum Reprod* 2005;20;923-27.
- (257) Nikolaou D, Lavery S, Turner C, Margara R, Trew G. Is there a link between an extremely poor response to ovarian hyperstimulation and early ovarian failure? *Hum Reprod* 2002;17:1106-11.
- (258) Lawson R, El-Toukhy T, Kassab A, Taylor A, Braude P, Parsons J et al. Poor response to ovulation induction is a stronger predictor of early menopause than elevated basal FSH : a life table analysis. *Hum Reprod* 2003;18:527-33.
- (259) van Rooij IA, Tonkelaar I, Broekmans FJ, Looman CW, Scheffer GJ, de Jong FH et al. Anti-müllerian hormone is a promising predictor for the occurrence of the menopausal transition. *Menopause* 2004;11:601-6.

-
- (260) Feyereisen E, Méndez Lozano DH, Taieb J, Hesters L, Frydman R, Fanchin R. Anti-Müllerian hormone: clinical insights into a promising biomarker of ovarian follicular status. *Reprod Biomed Online* 2006;12:695-703.